

**Einfluss von Hämabbauprodukten auf die
Vasoreaktivität zerebraler Arteriolen im akuten
Hirnschnitt der Maus**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Niklas Langguth

geboren am 22.03.1995 in Soest

Gutachter:

- 1.) Prof. Dr. rer. nat. Knut Holthoff, Jena
- 2.) Prof. Dr. rer. nat. Georg Pohnert, Jena
- 3.) Prof. Dr. rer. nat. Diana Imhof, Bonn

Tag der öffentlichen Verteidigung: 10.11.2020

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	11
1. Einleitung	13
1.1 Subarachnoidalblutung	13
1.1.1 Definition, Epidemiologie & Risikofaktoren	13
1.1.2 Symptome & Diagnostik	14
1.1.3 Verlauf, Komplikationen & Therapiemöglichkeiten	17
1.2 Der BK-Kanal	20
1.2.1 Aufbau und Struktur	21
1.2.2 Physiologische Funktion	23
1.3 Hämabbauprodukte und ihre Wirkung	25
1.3.1 Propentdyopents (PDPs)	26
1.3.2 Bilirubin-Oxidations-Endprodukte (BOXes)	27
1.3.3 Interaktion mit dem BK-Kanal	28
1.4 Zerebraler Vasospasmus	29
1.4.1 Pathomechanismus	29
1.4.2 Therapiemöglichkeiten und -erfolge	31
1.5 Wirkung von Nahinfrarotlicht	32
1.5.1 Physiologie des NO-Stoffwechsels	32
1.5.2 NIR-Wirkung in Geweben	34
2. Ziele der Arbeit	35
3. Material und Methoden	37
3.1 Versuchstiere	37
3.2 Genotypisierung	38
3.3 Lösungen	40
3.3.1 aCSF-Lösungen	40
3.3.2 Injektionslösung (EC-Lösung)	43

3.4 Substanzen	43
3.4.1 L-NAME	43
3.4.2 Propentdyopents (PDPs)	43
3.4.3 Z-BOX A syn	45
3.4.4 E-BOX A syn	46
3.4.5 Z-BOX C deg.....	46
3.4.6 DAF-FM-DA	47
3.5 Hirnschnittpräparation.....	47
3.6 Mikroskopie	48
3.6.1 DIC-Mikroskopie.....	48
3.6.2 Konfokale Mikroskopie/Fluoreszenzdetektion	50
3.7 Versuchsdesign.....	50
3.7.1 Einwaschung der HDPs	50
3.7.2 Infrarot-Bestrahlung des Hirnschnitts	53
3.7.3 Fluoreszenzversuche DAF-FM-DA	53
3.8 Auswertung.....	54
3.8.1 Gefäßdurchmesser Messung	54
3.8.2 Auswertung Fluoreszenz.....	55
3.10 Nachanalyse der HDP Proben	57
3.11 Statistik	58
4. Ergebnisse	60
4.1 Stabilität unter aCSF	60
4.2 Vorspannung durch L-NAME	60
4.2.1 L-NAME über 70 Minuten.....	60
4.2.2 L-NAME über 145 Minuten an WT und KO	61
4.3 Konzentrationsuntersuchungen zu BOX A & PDP A	63
4.3.1 Z-PDP A1/2 syn	63
4.3.2 Z-BOX A syn	64

4.4 Einzelisomere der PDPs	65
4.5 E-BOX A syn	69
4.6 BOX C deg.....	70
4.7 Infrarot.....	71
4.7.1 NIR-Bestrahlung des Hirnschnitts	71
4.7.2 NIR-Bestrahlung der HDP Proben	72
4.7.3 NO-Freisetzung (DAF-FM-DA).....	73
4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	76
5. Diskussion	78
5.1 Methoden	78
5.1.1 Mausmodell.....	78
5.1.2 Reinheit der HDPs	79
5.1.3 Vorspannung mit L-NAME und Versuchsdesign	80
5.1.4 Nachweis der NO-Freisetzung mittels DAF-FM-DA	82
5.2 Ergebnisse.....	84
5.2.1 Effekt von L-NAME über 145 Minuten.....	84
5.2.2 Konzentrationsabhängigkeit der HDPs	85
5.2.3 Effekt der PDP-Einzelisomere.....	87
5.2.4 Wirkverlust bei Umwandlung von Z-BOX A zu E-BOX A	88
5.2.5 Wirksamkeit von BOX C auf zerebrale Arteriolen.....	90
5.2.6 Nahinfrarotbestrahlung als mögliche Therapieoption	90
6. Schlussfolgerungen	94
Literatur- und Quellenverzeichnis.....	95
Anhang	107
Danksagung.....	107
Ehrenwörtliche Erklärung.....	109

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
aCSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i> (künstlicher Liquor)
ADC	Analog-Digital-Converter
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
AE	<i>elution buffer</i>
AL	<i>lysis buffer</i>
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
AOTF	akustooptischer Modulator (<i>acusto-optical tunable filter</i>)
ATL	<i>tissue lysis buffer</i>
AW	<i>wash buffer</i>
BK-Kanal	spannungs- und kalziumabhängiger Kaliumkanal mit hoher K ⁺ -Leitfähigkeit (<i>big conductance</i>)
BOX	Bilirubin-Oxidations-Produkt
BRAT	<i>barrow ruptured aneurysm trial</i> (Studie)
C	Cytosin
c-	Centi- (Größenordnung)
°C	Grad Celsius (Temperatur)
C57BL/6J	Mausstamm aus dem <i>The Jackson Laboratory</i>
Ca ²⁺	Kalziumion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCD	<i>charge-coupled device</i> (Kamera)
cCT/CT	(kranielle) Computertomographie
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i> (Liquor)
DAF-FM-DA	4-Amino-5-Methyamino-2',7'-Difluorofluorescein-Diacetat (Fluoreszenzfarbstoff für Stickstoffmonoxid)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
deg	degradiers Abbauprodukt (aus Bilirubinabbau)

DIC	<i>differential interference contrast</i> (differentieller Interferenzkontrast)
DIND	<i>delayed ischemic neurological deficit</i> (verzögertes ischämisches neurologisches Defizit)
DMSO	Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure; Erbinformation)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSA	digitale Subtraktionsangiographie
<i>E</i> -	<i>E</i> - bzw. <i>trans</i> -Isomerie an der Doppelbindung im HDP-Molekül
EKG	Elektrokardiogramm
ET-1	Endothelin-1
Fe ²⁺	Eisenion
FLAIR	<i>fluid attenuated inversion recovery</i> (MRT-Wichtung)
g	Gramm
G	Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H ₀	Nullhypothese
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure (Chlorwasserstoff)
HDP	<i>heme degradation product</i> (Hämabbauprodukt)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (Puffer)
HO-1/2	Hämoxygenase-1/2
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
IAAC	Institut für Analytische und Anorganische Chemie (Jena)
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i> (Interzelluläres Adhäsionsmolekül)
IK-Kanal	Kaliumkanal mit mittlerer Leitgeschwindigkeit (<i>intermediate conductance</i>)
IP ₃	Inositoltriphosphat
IR-A/B	Infrarot-A/B-Strahlung

ISAT	<i>international subarachnoid aneurysm trial</i> (Studie)
i.v.	intravenös
K ⁺	Kaliumion
K _v	spannungsabhängige Kaliumkanäle
K _{2D}	Tandem-Porendomänen-Kaliumkanäle
K _{IR}	einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle
K _{Ca}	Kalzium-abhängige Kaliumkanäle
KCl	Kaliumchlorid
KHK	koronare Herzkrankheit
KO	Knockout
l	Liter
L-NAME	L-Nitro-Arginin-Methyl-Ester
LWD	<i>long working distance</i> (Objektiv)
M	Molar (Einheit der Konzentration)
m	Meter
m-	Milli- (Größenordnung)
μ-	Mikro- (Größenordnung)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten(n)
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (Druckeinheit)
mol	Mol (Einheit der Stoffmenge)
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
MΩ	Megaohm (Widerstand)
n-	Nano- (Größenordnung)
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NIR	Nahinfrarot
NO	Stickstoffmonoxid
(n-/e-/i-)NOS	(neuronale/endotheliale/induzierbare) Stickstoffmonoxid-Synthase
n.s.	nicht signifikant

O ₂	Sauerstoff
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDP	Propentdyopent
PGI ₂	Prostacyclin
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität)
PKA/PKG	Proteinkinase A/G
psi	<i>pound per square inch</i> (Druck)
RCK-1/2-Domäne	<i>regulation of conductance for potassium</i>
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
Rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungszahl)
RyR	Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunde(n)
SAB	Subarachnoidalblutung
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwerts)
SK-Kanal	Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit (<i>small conductance</i>)
Slo1	Gensequenz, welche für den BK-Kanal kodiert
Slo1 ^{+/-}	heterozygotes Slo1-Gen
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
syn	synthetisiertes Abbauprodukt
T	Thymidin
TierSchG	Tierschutzgesetz
TXA ₂	Thromboxan
UHPLC-MS	<i>ultra high performance liquid chromatography – mass spectrometry</i> (Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie - Massenspektrometrie)
UV	ultraviolettes Licht
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i> (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)
Vis	<i>visible light</i> (Sichtbares Licht)
VSD	<i>voltage sensor domain</i> (Spannungssensitive Domäne)

W	Watt
WT	Wildtyp
xg	x-fache Erdbeschleunigung
Z-	Z- bzw. <i>cis</i> -Isomerie an der Doppelbindung im HDP-Molekül
ZET	zentrale experimentelle Tierhaltung (Universitätsklinikum Jena)
ZVD	zentraler Venendruck

Zusammenfassung

Das klinische Bild der Subarachnoidalblutung (SAB) geht mit vielen Komplikationen einher. Neben der hohen Letalitätsrate können nach überstandener Initialblutung schwere Komplikationen auftreten. Dazu gehören erneute Blutungen, ein Hydrozephalus und der verzögerte zerebrale Vasospasmus, die die klinische Prognose des Patienten senken können. Der zerebrale Vasospasmus ist häufig mit einem verzögerten ischämischen neurologischen Defizit vergesellschaftet und ist bis heute in seiner Entstehung nicht vollständig verstanden. Eine kausale Therapie existiert nicht, es findet lediglich eine symptomatische Behandlung statt.

Die Entstehung des Vasospasmus ist ein multifaktorielles Geschehen, in das viele Pathomechanismen einfließen. Eine Rolle spielen oxidative Abbauprodukte des Hämoglobins (HDPs), das während der Blutung in den Liquorraum gelangt. Die vasokonstriktive Wirkung der Bilirubin-Oxidations-Endprodukte (BOXes) konnte bereits in einer vorangegangenen Studie an Hand eines *in vitro* Modelles gezeigt werden.

Ziel der Arbeit war, weitere Abbauprodukte auf ihre vasokonstriktorische Wirkung bei penetrierenden Arteriolen zu testen. Im Fokus standen sowohl die Propentdyopents (PDPs), die Intermediate des oxidativen Hämabbaus darstellen, als auch ein neu entdecktes Mitglied der BOXes, das sogenannte BOX C. Außerdem sollten Dosis-Wirkungskurven der Substanzen erstellt werden, um die Relevanz dieser Moleküle für den Pathomechanismus der SAB abzuschätzen.

Ein weiteres Augenmerk lag auf möglichen Therapieansätzen. Ein Ansatz wäre die Bestrahlung der HDPs mit ultravioletttem Licht, um eine Konfigurationsänderung von der sogenannten Z- in die E- Konfiguration zu bewirken. Eine mögliche Änderung der Vasoaktivität des entstandenen Isomers könnte von therapeutischem Nutzen sein.

Weiterhin sollte der Einsatz von Nahinfrarotlicht (NIR), als mögliche Gegenmaßnahme zum Vasospasmus, getestet werden. Über die so induzierte Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), einem potenten Vasodilatator, wäre auch hier eine Therapie denkbar.

Untersuchungsobjekt waren die penetrierenden Arteriolen im visuellen Kortex der Maus im *in vitro*-Hirnschnittmodell. Die zu testenden HDPs wurden über die Badperfusion eingewaschen und ihre vasoaktive Wirkung als Änderung des

Gefäßdurchmessers quantifiziert. Sowohl PDPs als auch BOXes zeigten eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung. PDP-Konzentrationen, die auch in Liquorproben von SAB-Patienten nachgewiesen wurden, zeigten dabei signifikante vasokonstriktive Wirkung. Im Gegensatz dazu lagen die Konzentrationen der BOXes in den Liquorproben der Patienten unterhalb der festgestellten wirksamen Dosis. Während die vasokonstriktive Wirkung bislang nur vom PDP-Gemisch bekannt war, riefen drei von vier Einzelisomere der PDPs (A1, A2, und B2) eine signifikante Kontraktion der Arteriolen hervor.

BOX C bewirkte ebenfalls eine signifikante Kontraktion penetrierender Arteriolen. Diese Gefäßverengung war abhängig von der Expression funktioneller BK-Kanäle, da sie in Hirnschnitten von BK-Kanal defizienten Tieren nicht auftrat.

Beide potentiellen Therapieansätze wurden erfolgreich getestet. Zum einen führte die vorherige Bestrahlung der eingesetzten Z-BOX A Lösung mit ultravioletttem Licht zu einem Ausbleiben der Kontraktion penetrierender Arteriolen nach dem Einwaschen der Substanz. Zum anderen induzierte die NIR-Bestrahlung von penetrierenden Arteriolen eine Dilatation der Gefäße. Dabei zeigte der NO-Indikator DAF-FM-DA unter gleichen Bedingungen einen Anstieg in seiner Fluoreszenz innerhalb der ersten 15 Minuten, was auf eine Erhöhung der NO-Konzentration im Hirnschnitt hinweist.

Diese *in vitro*-Ergebnisse sind ein erstes Indiz für eine Interaktion zwischen NIR und dem NO-Stoffwechsel. Weiterführende Experimente mit NO-freisetzenden Molekülen sowie Messungen unter *in vivo*-Bedingungen wären die nächsten Schritte, um die Ergebnisse zu validieren und um das Potential für die Entwicklung einer Prävention des zerebralen Vasospasmus abschätzen zu können.

1. Einleitung

1.1 Subarachnoidalblutung

1.1.1 Definition, Epidemiologie & Risikofaktoren

Bei der Subarachnoidalblutung (SAB) handelt es sich um eine meist arterielle Einblutung in den Subarachnoidalraum. Dieser mit Liquor gefüllte Hohlraum befindet sich zwischen den zwei Anteilen der weichen Hirnhaut (Leptomeninx), der Arachnoidea mater und der Pia mater (Abb.1).

Die SAB wird zu den hämorrhagischen Schlaganfällen gezählt und muss von den ischämischen Schlaganfällen, welche meist aufgrund thromboembolischer Ereignisse geschehen, abgegrenzt werden.

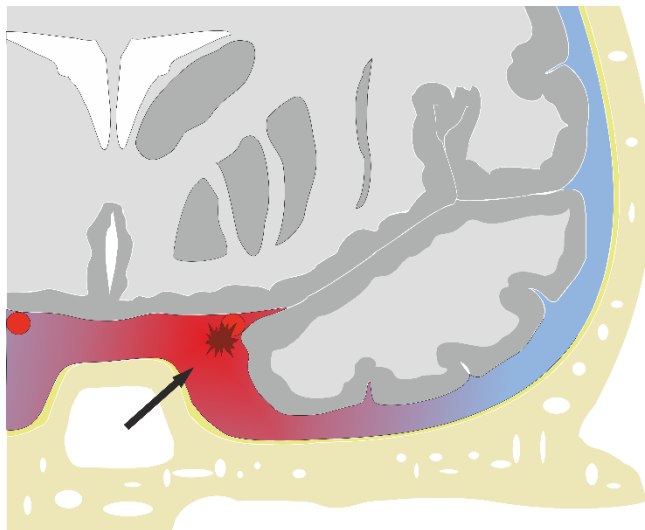


Abb.1: Schematische Darstellung einer Subarachnoidalblutung nach Ruptur eines Aneurysmas am Circulus arteriosus willisii. Das Blut verteilt sich im gesamten Liquorraum. Das rupturierte Aneurysma ist mit einem Pfeil markiert. Dargestellt ist ein Koronarschnitt.

Unterschieden wird weiterhin zwischen einer traumatisch bedingten (z.B. bei Schädel-Hirn-Trauma) und einer nicht-traumatischen spontanen SAB, die zusammen 5% aller Apoplexien ausmachen (Bederson et al. 2009). Ursache für eine spontane SAB ist dabei in 85% der Fälle die akute Ruptur eines Aneurysmas am Circulus arteriosus willisii. Diese meist sackförmigen Ausstülpungen der Gefäßwand können erst im Laufe des Lebens entstehen oder durch hereditäre Erkrankungen, die mit einer Degeneration des Bindegewebes einhergehen, bereits angeboren sein. Zu diesen Krankheitsbildern zählen u.a. das Ehlers-Danlos-Syndrom oder die polyzystische Nierenerkrankung. Seltener verursachen zerebrale oder spinale Angiome eine spontane SAB (Schievink et al. 1994).

Bestimmte Risikofaktoren können allerdings die Wahrscheinlichkeit für eine Ruptur erhöhen. So gehen arterielle Hypertonie, Drogenabusus (v.a. Kokain), Alkohol- und Tabakkonsum mit einer steigenden Blutungsgefahr einher. Systemische Erkrankungen wie Lupus erythematodes oder Granulomatose mit Polyangiitis begünstigen ebenfalls das Reißen der arteriellen Wand. Generell können aber alle Faktoren, die zu arteriosklerotischen Veränderungen führen (Adipositas, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie), die Aneurysma-Genese begünstigen (Masuhr et al. 2013)

In etwa einem Drittel der Fälle geschieht die Aneurysmaruptur während körperlicher Anstrengung, die zur Blutdruckerhöhung führt (z.B. Heben schwerer Lasten oder Betätigung der Bauchpresse bei der Defäkation). Der Großteil tritt allerdings ohne erkennbaren Auslöser auf.

Die Inzidenz der SAB beträgt in Mitteleuropa und Nordamerika ca. 6-7/100.000 Personen pro Jahr. Betroffen sind meist Personen mit einem mittleren Alter um die 50 Jahre. Die 30-Tages-Letalität beträgt ca. 35% (Feigin et al. 2009). Etwa 10% der Patienten versterben bereits vor Einlieferung ins Krankenhaus, weitere 10% innerhalb der ersten 24 Stunden. Frauen weisen ein 1,3-fach erhöhtes Risiko auf, eine SAB zu erleiden (Ziu und Mesfin 2017).

1.1.2 Symptome & Diagnostik

Leitsymptom einer Subarachnoidalblutung ist ein plötzlich einsetzender Kopfschmerz, der seine maximale Schmerzintensität sofort nach der Ruptur des Aneurysmas erreicht. Dieser sogenannte „Vernichtungskopfschmerz“ wird von vielen Patienten als der am stärksten empfindbare Schmerz beschrieben. Neben Übelkeit und Erbrechen treten meist Zeichen eines Meningismus auf.

Häufig zeigen die Patienten eine Vigilanzminderung mit psychomotorischer Hemmung bei Einlieferung. Grund hierfür ist eine intrakranielle Drucksteigerung aufgrund des einströmenden Blutvolumens in den Liquorraum. Erreichen die Patienten in einem komatösen Zustand die Klinik, ist mit einer hohen Mortalitätsrate zu rechnen.

Des Weiteren treten fokale neurologische Ausfälle wie Hirnnervenparesen, Aphasien oder Gesichtsfeldausfälle auf. Besonders häufig ist der Nervus oculomotorius betroffen, was zu einer ein- oder beidseitigen Erweiterung der Pupille ohne Lichtreagibilität führt. In etwa 10-20% der Fälle beschreiben Patienten ebenfalls ein heftiges spontanes Kopfschmerzereignis, das Tage bis Wochen zurückliegen kann und reversibel ist. Diese „Warnblutung“ wird allerdings häufig nicht als stattgefundene SAB erkannt, da der Patient keine sonstigen anhaltenden Symptome zeigt (Masuhr et al. 2013).

Die SAB ist ein medizinischer Notfall und bedarf einer sofortigen stationären Einweisung auf eine Intensivstation mit ständiger Überwachung der Vitalparameter.

Weisen die Symptome auf eine SAB hin, ist eine sofortige kranielle Computertomographie (cCT) indiziert. Bei dieser Schnittbilddiagnostik kann eine Ansammlung von Blut im Subarachnoidalraum detektiert werden. Die Methode besitzt innerhalb von 24h eine Sensitivität von 95%. Eine Magnetresonanztomographie (MRT) in Spin-Echo oder FLAIR-Sequenz weist eine SAB mit ähnlich hoher Sensitivität nach, ist aber aufgrund schlechterer Verfügbarkeit und höherem Zeitaufwand bei einer frischen SAB nicht die Methode erster Wahl (Steinmetz 2012). Liegt die vermutete Ruptur allerdings länger zurück, lassen sich die Blutrückstände um einiges besser in der MRT (T1- und T2-Wichtung) als in der CT nachweisen.

Kann in den bildgebenden Verfahren keine SAB diagnostiziert werden, der begründete Verdacht besteht aber aufgrund der Symptomatik weiterhin, wird eine Lumbalpunktion durchgeführt. Bei stattgefundener SAB ist nach 8-12 Stunden eine Xanthochromie im Überstand nachweisbar. Hämoglobin und seine Abbauprodukte (u.a. Bilirubin) färben den natürlicherweise farblosen Liquor gelblich bis rötlich. Dabei ist die visuelle Inspektion vor einem weißen Hintergrund durch einen erfahrenen Arzt ausreichend als Nachweis (Linn et al. 2005).

Zur Klärung der Blutungsquelle wird bei Feststellung einer SAB eine Angiographie durchgeführt. Die Methode der Wahl ist die digitale Subtraktionsangiographie (DSA). Ist keine Blutungsquelle erkennbar, kann es sich um eine perimesenzephalale oder kortikale SAB handeln. Außerdem muss an spinale Blutungsquellen gedacht werden.

Bei ca. 15% der Fälle kann in der initialen Angiographie keine Blutungsquelle gefunden werden (Hacke 2016).

Eine mögliche Einteilung des Schweregrads einer SAB besteht in der Beurteilungsskala nach Hunt und Hess (Hunt und Hess 1968). Das Klassifizierungsschema, unterteilt in Grad I-V, richtet sich nach dem klinischen Erscheinungsbild und der Kardinalsymptomatik des Patienten, wird aber zunehmend durch die Einteilung der World Federation of Neurosurgical Societies (WFNS) abgelöst. In diesen Score fließt der anerkannte Glasgow Coma Scale (GCS) mit ein. Eine Übersicht ist in Tabelle 1 dargestellt.

Klinisches Erscheinungsbild/Symptomatik	
Grad I	asymptomatisch, leichter Kopfschmerz, leichter Meningismus
Grad II	starke Kopfschmerzen, Meningismus, keine Fokalneurologie außer Hirnnervenstörungen
Grad III	Somnolenz, Verwirrtheit, leichte Fokalneurologie
Grad IV	Sopor, mäßige bis schwere Hemiparese, vegetative Störungen
Grad V	Koma, Einklemmungszeichen

Tab.1: Klassifikation der SAB nach Hunt und Hess (1968)

Der festgestellte Schweregrad ist prognostisch bedeutsam und dient zur Operationsindikationsstellung. So sollte zum Beispiel bei Grad I-III eine frühzeitige Operation (bis zum 3. Tag) durchgeführt werden. Anders bei schwereren Verläufen (Grad IV-V), bei denen die Operationsentscheidung vom intrakraniellen Druck abhängig gemacht wird. Spätestens nach dem 12. Tag nach der Initialblutung sollte allerdings auch hier eine Intervention erfolgen. Dies sollte aber bei jedem Einzelfall individuell entschieden werden (Masuhr et al. 2013).

1.1.3 Verlauf, Komplikationen & Therapiemöglichkeiten

Nach der aufgetretenen initialen Einblutung in den Subarachnoidalraum ist der Verlauf der Erkrankung und damit der Heilungsprozess im größten Maße durch auftretende Komplikationen gekennzeichnet. Die größte Bedeutung haben dabei die Rezidivblutungen, der Hydrozephalus und die Entwicklung eines zerebralen Vasospasmus, der zu einer verzögerten Ischämie von Hirngewebe führen kann. Diese Komplikationen treten meist in einer typischen zeitlichen Abfolge auf (Abb.2).

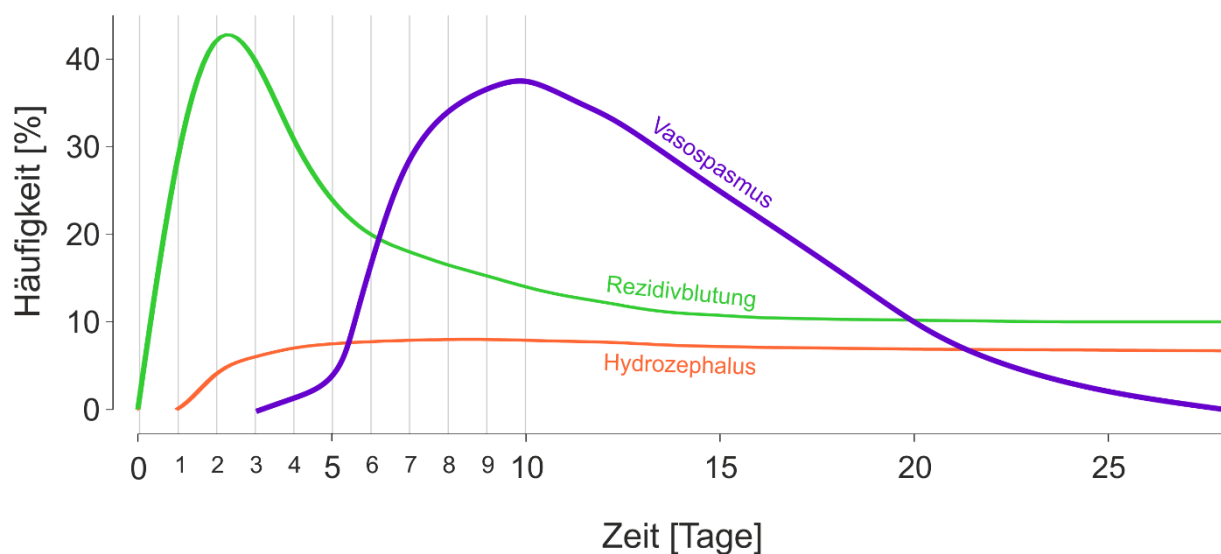


Abb.2: Charakteristisches Auftreten der drei Hauptkomplikationen Rezidivblutung, Vasospasmus und Hydrozephalus nach stattgefundener Subarachnoidalblutung (modifiziert nach Hacke 2016).

Mit einer Letalität von über 70% ist die Rezidivblutung das Hauptrisiko in der initialen posthämorrhagischen Phase für den Patienten, mit einem Gipfel nach 3-4 Tagen. Allerdings bleibt dieses Risiko auch lange Zeit danach noch bestehen. Durch leptomeningeale Verwachsungen brechen Rezidivblutungen häufig in das Hirngewebe oder die inneren Liquorräume ein, was zu einer schlechteren Prognose im Überleben führt. Die Patienten sterben häufig innerhalb weniger Tage.

Ein Hydrozephalus kann zu jedem Zeitpunkt der Erkrankung auftreten. Ein Häufigkeitsgipfel findet sich etwa nach einer Woche. Dabei werden die basalen Zisternen und vor allem die Arachnoidalzotten (*Granulationes arachnoideae*) durch Blutkoagel verlegt. Die dadurch herbeigeführte gestörte Liquorzirkulation

und -resorption führt zu einem intrakraniellen Druckanstieg mit vergrößerten inneren Liquorräumen und endet meist mit einer Verschlechterung der Vigilanz sowie anderen neurologischen Ausfallerscheinungen.

Der zerebrale Vasospasmus tritt hingegen etwas verzögert nach dem 4.-9. Tag auf und kann bis zu drei Wochen anhalten (Bendszus et al. 2016). Der Vasospasmus kann sowohl in den großen Hirnarterien, als auch in den Gefäßen der Mikrozirkulation auftreten und führt zu einer globalen Minderung der Gehirndurchblutung. Die entstehende Ischämie kann zu Paresen, Bewusstseinsstörungen und funktionellen Ausfällen in betroffenen Hirnarealen führen. Diese als *delayed ischemic neurological deficit* (DIND) bezeichnete Komplikation tritt in etwa 20% der Fälle auf und verschlechtert die Prognose des Patienten deutlich. Der Vasospasmus muss allerdings nicht zu weiteren Ausfallerscheinungen führen. So kann er in 40% der Fälle angiographisch zwar nachgewiesen werden, bleibt aber asymptomatisch.

Des Weiteren entwickeln manche Patienten zusätzliche Komplikationen. Dazu zählen Hyponatriämien durch verstärkte Natriurese, welche durch mechanische Irritation des Hypothalamus und Freisetzung des natriuretischen Peptids begründet wird (Berendes et al. 1997). Außerdem treten gehäuft epileptische Anfälle, Herzrhythmusstörungen und neurogene Lungenödeme bei Betroffenen auf (Mayer et al. 1994, Hart et al. 1981).

Die primäre Therapie der SAB dient der Aneurysmaausschaltung, sofern eine Blutungsquelle identifiziert werden konnte. Hierzu stehen zwei Varianten zur Verfügung: Das neurochirurgische *Clipping* oder das endovaskuläre *Coiling*.

Beim *Clipping* wird chirurgisch ein Gefäß-Clip an den Hals des Aneurysmas angelegt, sodass die Öffnung verschlossen wird. Eine besonders gute Prognose hat diese Technik bei Patienten mit einem klinisch günstigen Verlauf der SAB (Grad I-III), ohne aufgetretenen Vasospasmus und bei Durchführung der Operation innerhalb der ersten drei Tage.

Alternativ zu diesem Prozedere steht das *Coiling*. Bei diesem endovaskulär durchgeführten Verfahren wird durch einen Neuroradiologen eine Platinspirale (*coil*) über einen Katheter in das zerebrale Gefäßsystem geschoben. Die Spirale wird im

Aneurysma platziert und fördert die lokale Thrombosierung. Die Blutungsquelle wird auf diese Weise verschlossen.

Nach aktueller Lage (ISAT-Studie) besitzt das *Coiling* eine bessere Prognose für das Überleben der Patienten. Auch wenn Rezidivblutungen nach dem *Clipping* seltener auftreten (Molyneux et al. 2015), wird aufgrund der höheren 5-Jahres-Überlebensrate zur endovaskulären Therapie geraten, wenn beide Verfahren möglich sind. Des Weiteren tritt nach dem *Coiling* eine kognitive Leistungsminderung mit geringerer Häufigkeit auf (Scott et al. 2010). Die sog. BRAT-Studie untersuchte ebenfalls Unterschiede in der Prognose nach *Clipping* und *Coiling*, konnte jedoch keinen Vorteil für eines der beiden Verfahren zeigen (Spetzler et al. 2015). So ist in jedem Einzelfall eine individuelle Therapieentscheidung zu treffen, die in Absprache mit allen involvierten Fachrichtungen gefällt werden sollte.

Zusätzlich findet neben der chirurgischen Therapie eine konservative Therapie statt. Da die SAB in allen Schweregraden lebensbedrohlich sein kann, ist eine intensivmedizinische Überwachung der Vitalparameter mit EKG, Blutdruckmessung, ZVD, Temperatur und Gewebeoxygenierung notwendig. Außerdem sollte täglich eine Doppler-Sonographie der großen Hirngefäße durchgeführt werden, um einen entstehenden Vasospasmus früh zu erkennen.

Anfänglich werden Sedativa und Analgetika, wie Diazepam und Buprenorphin, verabreicht. Hohe initiale Blutdruckwerte werden nach Möglichkeit, laut aktueller Leitlinie auf einen mittleren arteriellen Druck von 60-90mmHg gesenkt, bis das Aneurysma versorgt ist, um das Risiko einer Nachblutung so gering wie möglich zu halten (Steinmetz 2012). Niedrigmolekulare Heparine zur Thromboseprophylaxe sind erst nach erfolgreicher Aneurysmaversorgung indiziert.

Die Behandlung eines Hydrozephalus erfordert eine Ventrikeldrainage, über die der Liquor abgeleitet werden kann. Eine externe Ventrikeldrainage kann bis zu 10 Tage in Verwendung bleiben. Sollte dies keine Abhilfe schaffen, muss ein definitiver Shunt angelegt werden, der kontinuierlich den Liquor in die Bauchhöhle leitet, wo die Flüssigkeit schnell über das Peritoneum resorbiert werden kann.

Zur Prophylaxe des Vasospasmus bekommt der Patient alle 4 Stunden oral 60mg des Ca^{2+} -Kanal-Blockers Nimodipin verabreicht. Ist eine orale Gabe nicht möglich, kann das Medikament auch in einer Dosierung von 2mg/h i.v. gegeben werden.

Durch isotone Infusionslösungen soll eine Hyponatriämie mit Hypovolämie und Hypotension vermieden und eine Normovolämie angestrebt werden. Im Gegensatz zu früheren Behandlungsstrategien soll nach den aktuellen Leitlinien keine primärprophylaktische Hypertension aufgebaut werden, um das Risiko einer Reruptur gering zu halten. Im Falle eines manifesten Vasospasmus kann allerdings an eine Hypervolämie und Hypertension gedacht werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der endovaskulären, transluminalen Ballonangioplastie, bei der die Gefäße manuell aufgedehnt werden. Diese Methode wird allerdings aufgrund fehlender Studienlage nicht generell empfohlen und ist individuell abzuwägen (Steinmetz 2012). Trotz der mannigfaltigen Behandlungsmöglichkeiten lässt sich allerdings ein aufgetretener Vasospasmus häufig nicht zufriedenstellend behandeln.

1.2 Der BK-Kanal

Der BK-Kanal ist ein im menschlichen Körper ubiquitär exprimierter Kaliumkanal, der eine entscheidende Rolle in der Regulation des arteriellen Durchmessers spielt. Er steht außerdem in Verdacht, in der pathophysiologischen Entwicklung des zerebralen Vasospasmus nach einer Subarachnoidalblutung involviert zu sein.

Die große Familie der Kaliumkanäle lässt sich untergliedern in spannungsaktivierte Kaliumkanäle (K_v), Tandem-Porendomänen-Kaliumkanäle (K_{2P}), einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle (K_{IR}) und Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca}).

Der BK-Kanal – auch Maxi- K_{Ca} -Kanal oder $K_{Ca1.1}$ – zählt zu den Kalzium-aktivierten Kaliumkanälen, besitzt eine hohe Leitfähigkeit (*big conductance*) für Kaliumionen (K^+) und weist zusätzlich eine Spannungsabhängigkeit auf. Weitere Vertreter dieser Gruppe sind die IK-Kanäle mit einer mittleren Leitfähigkeit (*intermediate conductance*) und die SK-Kanäle mit einer geringen Leitfähigkeit für K^+ (*small conductance*). Im Gegensatz zu den BK-Kanälen weisen diese beiden Kanaltypen keine Spannungssensitivität auf und werden, abhängig vom intrazellulären Kalziumlevel, durch das kalziumbindende Protein Calmodulin gesteuert (Fanger et al. 1999, Xia et al. 1998). Dem gegenüber besitzt der BK-Kanal eigene Bindungsstellen für Kalzium, die in seinen Untereinheiten vorhanden sind (Schreiber und Salkoff 1997).

1.2.1 Aufbau und Struktur

Der BK-Kanal setzt sich zusammen aus jeweils 4 α - und 4 β -Untereinheiten (Abb.3). Ein Tetramer aus α -Untereinheiten formt den Porenkomplex des Kanals. In Assoziation zu jedem α -Monomer steht eine der β -Untereinheiten, die regulatorische Aufgaben erfüllt (Knaus et al. 1994). Allerdings ist das Vorhandensein der β -Untereinheiten nicht zwingend notwendig, um einen funktionsfähigen Kanal zu bilden (Toro et al. 1998).

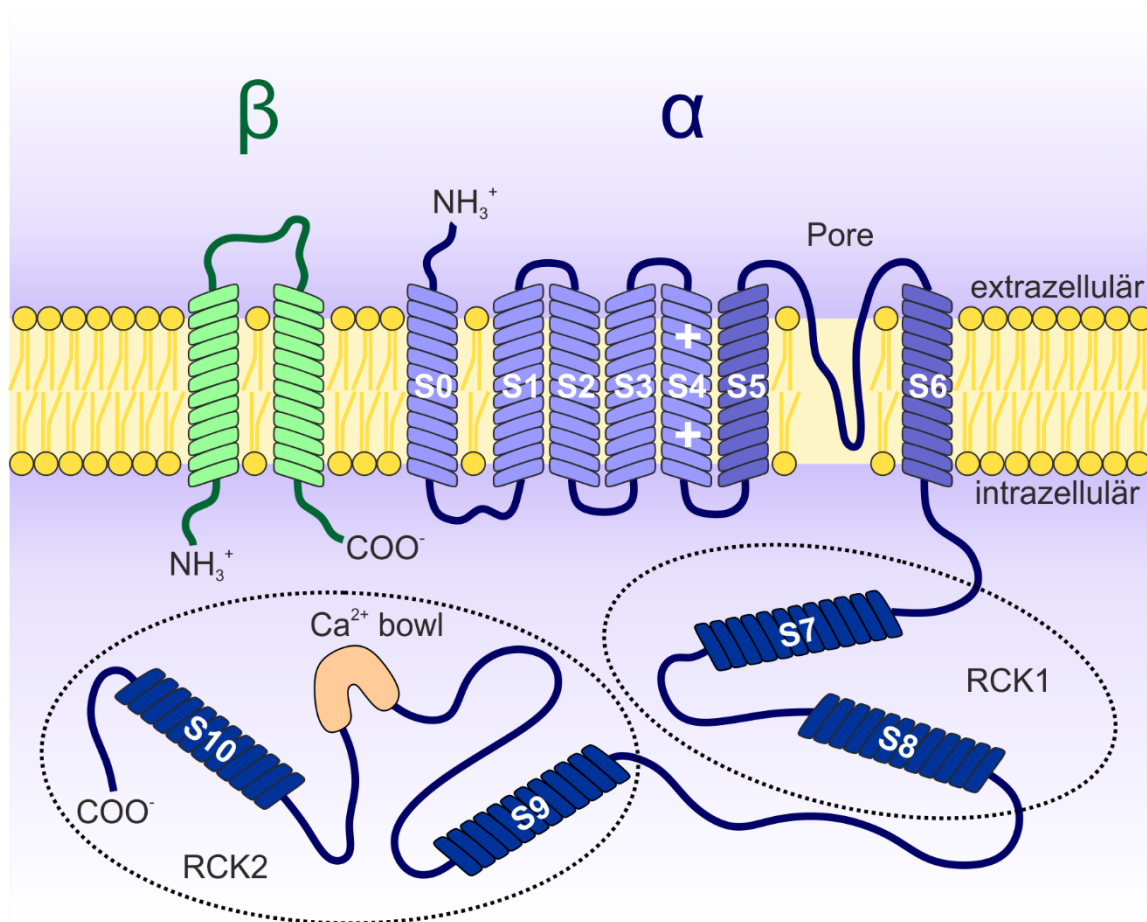


Abb.3: Schematische Darstellung der Struktur des BK-Kanals. Der porenformenden α -Untereinheit ist eine regulatorische β -Untereinheit angelagert. Die α -Untereinheit besitzt 7 Transmembrandomänen (S0-S6), wobei das Segment S4 die Spannungssensitivität des Kanals ausmacht. Die Kanalpore wird zwischen den Segmenten S5 und S6 geformt. Der zytosolische C-Terminus wird unterteilt in zwei RCK-Domänen (*regulation of conduction for potassium*), die Bindungsstellen für Ca^{2+} und andere Moleküle enthalten. Anders als andere Kanäle befindet sich das N-terminale Ende auf der extrazellulären Seite. Die β -Untereinheit steht in Interaktion mit dem S0-Segment.

Die α -Untereinheit besteht aus 11 hydrophoben Domänen (S0-S10), wobei auf der N-terminalen Seite die Segmente S0-S6 als Transmembrandomänen dienen und als „Kern-Region“ beschrieben werden (Butler et al. 1993). Ähnlich wie bei anderen spannungsabhängigen Kaliumkanälen befindet sich im Segment S4 eine Häufung an positiv geladenen Aminosäuren wie Lysin, Arginin oder Histidin. Deswegen wird die Region S1-S4 auch „*voltage sensor domain*“ (VSD) genannt. Die porenformende Region befindet sich in der Linkerregion zwischen S5 und S6 (Toro et al. 1998).

Die restlichen C-terminalen hydrophoben Domänen S7-S10 sind auf der zytosolischen Seite der Membran lokalisiert und bilden die sogenannte „Schwanz-Region“ der α -Untereinheit. Dieser Abschnitt weist viele Bindungsmotive für intrazelluläre Moleküle und Ionen auf und ist in der Lage, die Leitfähigkeit des Kanals zu beeinflussen. Unter anderem sind in diesem Teil Motive lokalisiert, die die intrinsische Ca^{2+} -Sensitivität des Kanals hervorrufen. Die sogenannte „ Ca^{2+} -bowl“, eine Kalziumbindungsstelle, wurde zwischen den Segmenten S9 und S10 beschrieben (Bao et al. 2004, Yuan et al. 2010). Des Weiteren findet sich eine zusätzliche Bindungsstelle für Ca^{2+} in der RCK1-Domäne (*regulation of conductance for potassium*), welche sich am N-terminalen Ende der „Schwanz-Region“ befindet und die Segmente S7 und S8 enthält (Krishnamoorthy et al. 2005). Durch allosterische Wechselwirkungen wird der Kanal bei Ca^{2+} -Bindung in den geöffneten Zustand überführt. Zusätzlich finden sich im gesamten Carboxyteil des Kanalproteins Phosphorylierungsstellen für die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) oder die cGMP-abhängige Proteinkinase G (Tian et al. 2001, Chen et al. 2005). Die RCK1-Domäne scheint des Weiteren sensitiv für Protonen (H^+), Kohlenstoffmonoxid (CO) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu sein (Hou et al. 2009).

Das Slo1- (*slowpoke*) oder KCNMA1-Gen ist das bisher einzig identifizierte, welches für die α -Untereinheit kodiert (Adelman et al. 1992). Durch unterschiedliche Spleißvarianten kann allerdings die Diversität des exprimierten Proteins erhöht werden. So finden sich unterschiedliche Varianten in glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Glia-Zellen und Neuronen. Dies erklärt die unterschiedliche Spannungssensitivität in verschiedenen Geweben (Saleem et al. 2009).

Eine weitere Möglichkeit der Modifikation ergibt sich durch die Anlagerung der akzessorischen β -Untereinheit, von der bisher die vier Versionen β 1- β 4 mit ihren Gensequenzen KCNMB1-4 bekannt sind (Brenner et al. 2000). Aufgebaut sind alle β -

Untereinheiten aus zwei transmembranären α -Helices, wobei sich sowohl der Amino- als auch der Carboxyterminus auf der zytosolischen Seite der Zellmembran befinden. In glatten Gefäßmuskelzellen ist die $\beta 1$ -Untereinheit die vorherrschende Variante (Salkoff et al. 2006). Funktionell hat diese Untereinheit Einfluss auf die Stromkinetik und die Ca^{2+} -Sensitivität des Kanals. So stabilisiert sie die Aktivierung des Spannungssensors sowohl im geöffneten, als auch im geschlossenen Zustand (Bao und Cox 2005). Außerdem befinden sich hier einige Angriffsstellen für Pharmaka (Dick et al. 2001). In Untersuchungen zu den β -Untereinheiten konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des BK-Kanals maximal ist, wenn jede der vier α -Untereinheiten eine β -Untereinheit assoziiert hat (Wang et al. 2002), auch wenn der Kanal alleine durch die α -Untereinheiten funktionsfähig wäre (Toro et al. 1998). Darüber hinaus konnte in Mäusen ohne β -Untereinheit erhöhter Blutdruck und eine gesteigerte Kontraktilität der Gefäße beobachtet werden (Brenner et al. 2000, Plüger et al. 2000). Ein ähnlicher Effekt tritt in Mäusen ohne funktionsfähige α -Untereinheit auf (Sausbier et al. 2004)

Neben der β -Untereinheit kann auch die γ -Untereinheit akzessorisch angelagert sein. Ihre Anwesenheit führt dazu, dass der BK-Kanal auch in nicht erregbaren Zellen bei normalen Ca^{2+} -Spiegeln aktiviert werden kann (Yan und Aldrich 2012, Yan und Aldrich 2010). Da die γ -Untereinheiten gewebespezifisch exprimiert werden und kaum in glatten Muskelzellen zu finden sind, wird an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen.

1.2.2 Physiologische Funktion

Aufgrund seines ubiquitären Vorkommens übernimmt der BK-Kanal in seinen unterschiedlichen Varianten eine Vielzahl von physiologischen Funktionen. An dieser Stelle soll, der Übersichtlichkeit halber, nur die Bedeutung des Kanals in glatten Gefäßmuskelzellen bei der Vasotonusregulation behandelt werden.

In Widerstandsgefäßen des arteriellen Systems führt ein intravasaler Druckanstieg durch z.B. ein gesteigertes Herz-Zeit-Volumen zu einer Konstriktion der Arterie. Dieser sogenannte Bayliss-Effekt ist wichtiger Bestandteil der myogenen Autoregulation des Blutdrucks im menschlichen Körper (Bayliss 1902). Bei ansteigendem Druck wird die Gefäßwand passiv gedehnt. Auf diese Weise kommt es

durch Öffnung mechanosensitiver Kationenkanäle zu einem initialen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen, die zu einer Depolarisation der glatten Gefäßmuskelzelle führen. Diese anfängliche Depolarisation aktiviert ihrerseits spannungsabhängige Kalziumkanäle, die weiteres Kalzium in die Zelle strömen lassen. Außerdem kommt es zu Ca^{2+} -Freisetzung (*calcium sparks*) aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch eine Aktivierung der Ryanodin-Rezeptoren (RyR). Der erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel führt über Interaktionen mit Calmodulin und der Myosin-Leichtkettenkinase zu einer Kontraktion der Muskelzellen und damit zu einer Gefäßverengung.

Der BK-Kanal wirkt diesem Effekt entgegen, sorgt so für einen stabilen Basaltonus und verhindert überschießende Gefäßkontraktionen, die eine Minderversorgung des perfundierten Gewebes nach sich ziehen würde. Das erhöhte Ca^{2+} -Level in der Zelle und die damit einhergehende Depolarisation führt zu einer Aktivierung des BK-Kanals (Brayden und Nelson 1992). Der dadurch entstehende Kalium-Ausstrom führt zu einer Hyperpolarisation der Zelle und wirkt somit dem kontraktile Impuls als negativer Feedback-Mechanismus entgegen. Auch eine direkte mechanosensitive Aktivierung wurde in Studien beschrieben, sodass der limitierende Prozess zeitgleich mit dem initialen KalziumEinstrom vonstattengeht (Kirber et al. 1992, Dopico et al. 1994).

Das Signalmolekül Inositol-Triphosphat (IP_3) soll nach aktuellem Forschungsstand mit seinem Rezeptor eine molekulare Kopplung mit dem BK-Kanal eingehen. Dies führt zu einer erhöhten Sensitivität des Kanals für Ca^{2+} (Zhao et al. 2010, Yang et al. 2013).

Der BK-Kanal wird zusätzlich durch viele andere in der Zelle vorkommende Substanzen beeinflusst. So wirken sich Protonen (H^+), Kohlenstoffmonoxid (CO), Fettsäuren, Phospholipide und Steroidhormone auf die Funktionalität des Kanals aus. Auch das bei Subarachnoidalblutungen entstehende Häm und einige Abbauprodukte konnten als mögliche Modulatoren identifiziert werden (Horrigan und Aldrich 2002).

Der BK-Kanal spielt also eine große Rolle in der autogenen Blutdruckregulation im menschlichen Gefäßsystem, von dem die Funktionalität vieler Organe abhängig ist. So finden sich im Gehirn viele dieser Kanäle in den glatten Gefäßmuskelzellen der Widerstandsgefäße, um eine konstante Blutperfusion gewährleisten zu können.

Kommt es allerdings zu einer Blockade dieses Mechanismus, so ist die Autoregulation gestört und fehlende negative Rückkopplungsmechanismen führen zu einer erhöhten Kontraktilität der zerebralen Arterien und Arteriolen.

1.3 Hämabbauprodukte und ihre Wirkung

Das nach einer Subarachnoidalblutung in den Liquorraum eingetretene Blut ist reich an Erythrozyten, die den roten Blutfarbstoff Hämoglobin enthalten. Durch Lyseprozesse wird dieses Hämoglobin freigesetzt und im Subarachnoidalraum durch enzymatische und nicht-enzymatische Prozesse abgebaut. Der Proteinanteil, das Globin, kann durch Proteasen in einzelne Aminosäuren gespalten und vom Körper wiederverwendet werden. Das für die Sauerstoffbindung verantwortliche Häm allerdings wird durch die Hämoxygenase (HO) zu Biliverdin, Eisen (Fe^{2+}) und CO gespalten. Es existieren zwei Formen dieses Enzyms. Die Hämoxygenase-1 (HO-1) ist eine induzierbare Form und findet sich vor allem in Zellen der Mikroglia. Aktiviert wird sie z.B. bei Eintreten von Blut in den Subarachnoidalraum (Turner et al. 1998). Die Hämoxygenase-2 (HO-2) ist dem gegenüber konstitutiv in vielen Geweben und Zelltypen, u.a. Neuronen und Endothelzellen, exprimiert (Govindaraju et al. 2005, Maines 2000). Durch die Biliverdin-Reduktase entsteht schließlich Bilirubin. Neben diesem enzymatischen Abbau gibt es auch einen oxidativen Abbauweg, welcher zu einer Vielzahl von Hämabbauprodukten (HDPs) führt. Unter diesen wurden bisher die Propentdyopents (PDPs) und die Bilirubin-Oxidations-Endprodukte (BOXes) aufgeklärt (Abb. 4).

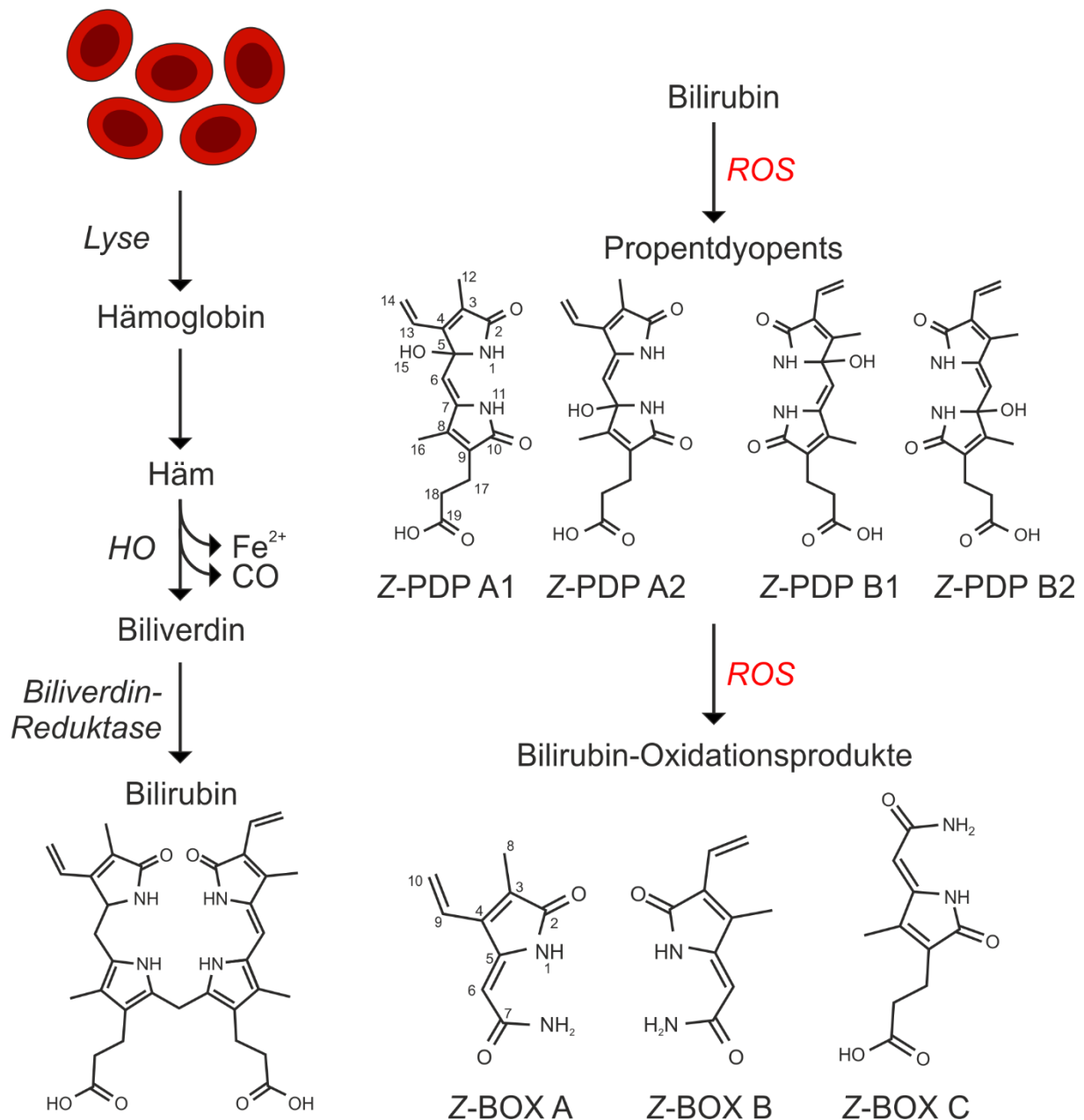


Abb.4: Schematische Darstellung der Entstehung von Propentdyopents (PDPs) und Bilirubin-Oxidationsprodukten (BOXes) durch enzymatischen Abbau und reaktive Sauerstoffspezies (ROS); HO=Hämoxygenase; Nummerierung der Atome am Beispiel von Z-PDP A1 und Z-BOX A

1.3.1 Propentdyopents (PDPs)

Der oxidative Abbau von Bilirubin erfolgt in bisher zwei bekannten Stufen. Zunächst entstehen unter Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) Intermediate des Degradationsweges. Diese werden auch Propentdyopents oder PDPs genannt (Ritter

et al. 2016). Erstmals wurde ihre Existenz im Jahr 1940 durch Fischer und Dobeneck beschrieben, doch konnte weder ihre genaue Struktur untersucht werden, noch wusste man von ihrem Vorkommen im Liquor. Damals wurden sie in einen Zusammenhang mit dem Leber- und Gallenstoffwechsel gebracht (Fischer und Dobeneck 1940). 2016 gelang Ritter et al. die Molekülstruktur zu identifizieren (Ritter et al. 2016). Die PDPs konnten im Liquor von SAB-Patienten (Joerk und Ritter et al, 2018) und in Proben von Gallensteinen und Gallensaft nachgewiesen werden (Ritter et al. 2016). Es existieren die vier Isomere PDP A1, PDP A2, PDP B1 und PDP B2, wo von einige 1975 durch Bonnett et al. beschrieben wurden, jedoch nicht weiter aufgeklärt werden konnten (Bonnett und Stewart 1975). Dabei richtet sich die Nomenklatur von A- und B-Isomeren danach, welches Bilirubin-Oxidations-Produkt bei dem weiteren oxidativen Abbau entsteht. Die PDPs bestehen aus je zwei Pyrrolringen des Bilirubins mit ihren jeweiligen funktionellen Gruppen. Der Unterschied zwischen A- und B-Isomeren ergibt sich aus der Position der Methyl- und der Vinylgruppe am oberen Pyrrolring (C2-C5). Bei PDP A1 und A2 befinden sich die Methylgruppe am C3-Atom und die Vinylgruppe am C4-Atom des Pyrrolrings. Bei den B-Isomeren sind diese zwei Gruppen getauscht. Innerhalb der Gruppen besteht der Unterschied zwischen den Einzelisomeren in der Position einer OH-Gruppe, die entweder am C5- (PDP A1 und B1) oder am C7-Atom (PDP A2 und B2) lokalisiert sein kann. Durch Isomerisierung ist es möglich, dass die Position der OH-Gruppe sich ändert, was dazu führt, dass PDP A1 und A2, sowie PDP B1 und B2 in einem Gleichgewicht liegen. Beim oxidativen Abbau entstehen die Intermediate in einem Verhältnis von 4:1 [PDP A1/PDP A2] bzw. 2:3 [PDP B1/PDP B2] (Ritter et al. 2016).

1.3.2 Bilirubin-Oxidations-Endprodukte (BOXes)

Ausgehend von den PDPs entstehen durch weiteren oxidativen Abbau die Bilirubin-Oxidations-Endprodukte (BOXes) (Ritter et al. 2016). Allerdings scheint auch eine direkte Oxidation von Bilirubin zu den BOXes zu existieren (Clark et al. 2002). Aktuell kann zwischen den drei Isomeren BOX A, B und C unterschieden werden. Die Existenz von BOX A und B ist schon seit längerem bekannt (Kranc et al., 2000), wogegen BOX C erst vor kurzer Zeit entdeckt wurde (Ritter et al. 2018). Wie auch die PDPs unterscheiden sich BOX A und BOX B lediglich in der Position der Methyl-

bzw. Vinylgruppe am C3- und C4-Atom des Pyrrolrings (Abb. 4). Beide Isomere konnten in Liquorproben von Patienten mit SAB nachgewiesen werden (Joerk and Ritter et al. 2018). Pyne-Geithman et al. (2005) zeigten in ihrer Arbeit, dass die Konzentration der BOXes gemeinsam mit dem gemessenen Level von Bilirubin und dem oxidativen Stress ansteigt und etwa nach 6-8 Tagen ihr Maximum erreicht (Pyne-Geithman et al. 2005). Die Substanzen weisen eine Photosensibilität im UV-Bereich auf. Wurster et al. zeigten eine komplette Degradation nach 24 Stunden Bestrahlungsdauer (Wurster et al. 2008).

Über BOX C ist noch nicht viel bekannt. Es stellt ein Analogon zu BOX A und B dar, wobei anstatt des Methyl-/Vinylrings der Methyl-/Propionsäurering des Bilirubins beim Abbau intakt geblieben ist (Abb.4). Es kann beim oxidativen Abbau von Bilirubin bzw. PDPs entstehen, wurde bisher allerdings nur in menschlichen Proben von Gallensteinen, nicht jedoch im Liquor nachgewiesen (Ritter et al. 2018).

Die beschriebenen HDPs besitzen zwei mögliche Konfigurationen. Die *Z*- bzw. *E*-Konfiguration bezieht sich dabei auf die Stellung der Substituenten mit der höchsten Ordnung an einer Doppelbindung. Befinden sich diese zusammen auf einer Seite, spricht man von der *Z*-Konfiguration. Sind die Substituenten auf entgegengesetzten Seiten lokalisiert, so wird dies als *E*-Konfiguration beschrieben (Klopfleisch et al. 2013).

1.3.3 Interaktion mit dem BK-Kanal

HDPs scheinen in der Entstehung des zerebralen Vasospasmus eine Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass die Applikation von BOXes (BOX A und B) eine erhöhte Wandspannung in *in vitro*-Gefäßpräparaten von Schweinen bewirkt (Pyne et al. 2000, Pyne et al. 2003). Clark et al. (2002) beschreiben die Entstehung eines zerebralen Vasospasmus nach Applikation von BOXes durch ein kraniales Fenster auf den Kortex von Ratten nach 30 Minuten (Clark et al. 2002). Außerdem konnte ein konstriktives Potential von BOXes-Gemischen und den Einzelisomeren BOX A und BOX B an penetrierenden Arteriolen in akuten Hirnschnitten der Maus nachgewiesen werden. Dieser Effekt blieb allerdings aus, wenn die Substanzen bei einer Maus appliziert wurden, bei der der BK-Kanal nicht funktionsfähig exprimiert wurde (Joerk et al. 2014). Bei den Slo1-Knockout-Mäusen ist die α -Untereinheit des

Kanals nicht suffizient, es kann folglich keine Kanalpore gebildet werden. Mittels dieses Mausmodells ist es möglich, die Rolle des BK-Kanals bei der Entstehung eines Vasospasmus besser einzuschätzen. Ein durch HDPs inhibierter BK-Kanal kann so seine unter 1.2.2 beschriebene Funktion zur Regelung des arteriellen Tonus nicht mehr im nötigen Maß ausführen. Durch den fehlenden Kaliumausstrom führt die fehlende Hyperpolarisation nicht mehr zu einem Schließen der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle, sodass das Signal zur Kontraktion für die Zelle weiterhin bestehen bleibt. Für BOX A und BOX B konnte ein Bindungsmotiv in der RCK1-Domäne nachgewiesen werden (Hou et al. 2011). Die Bindung führt hier wahrscheinlich durch allosterische Änderungen zu einer Stabilisierung des geschlossenen Zustandes und somit zu einer geringeren Öffnungsrate (Niu et al. 2004).

Auch PDPs führten im *in vitro*- und *in vivo*-Modell zu einer Gefäßverengung zerebraler Arteriolen, die ebenfalls abhängig von der Expression des BK-Kanals ist (Joerk and Ritter et al. 2018).

1.4 Zerebraler Vasospasmus

1.4.1 Pathomechanismus

Der verzögerte zerebrale Vasospasmus entsteht als Resultat aus einer Vielzahl von ablaufenden Prozessen, die gegenwärtig noch nicht vollständig aufgedeckt werden konnten. Insgesamt scheint die Subarachnoidalblutung zu einem Ungleichgewicht von Vasokonstriktoren und -dilatoren zu führen (Kolias et al. 2009) und dadurch einen Vasospasmus auszulösen.

Wie unter 1.3.3 beschrieben, führen oxidative Abbauprodukte des Hämoglobins zu einer Inhibition des BK-Kanals und damit zu einer Verschiebung in der Autoregulation der glatten Gefäßmuskelzelle. Folge ist eine Vasokonstriktion (Joerk et al. 2014, Clark und Sharp 2006).

Neben diesen Effekten des Hämoglobins und seiner Metabolite existiert allerdings eine Vielzahl weiterer pathophysiologischer Abläufe, die den Vasospasmus begünstigen.

Durch eine geringere Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) fällt ein hochpotenter Vasodilatator aus. Hierfür bestehen drei verschiedene Gründe: Beim sogenannten „NO-scavenging“ wird ein Teil des freigesetzten NO an Hämoglobin gebunden und kann seinen Wirkort in der glatten Gefäßmuskelzelle nicht mehr erreichen. Zusätzlich scheint die Produktion von NO durch die NO-Synthasen eingeschränkt zu sein. Ein Verlust von neuronalem Gewebe führt gleichermaßen zu einem Verlust der neuronalen NO-Synthase (nNOS) (Pluta et al. 1996). Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) wird laut Jung et al. (2004) durch asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) gehemmt, das durch den vermehrten Abbau von Hämoglobin entsteht (Jung et al. 2004). Folge ist das Fehlen einer der wichtigsten kurzfristigen Vasodilatoren im zerebralen Gefäßsystem.

Die erhöhte Entstehung freier Radikale führt zusätzlich zur Inaktivierung von freiem NO. Darüber hinaus werden Zellen durch Radikale massiv geschädigt. Die Bildung von Lipidperoxiden fördert zusätzlich die Spasmusgenese und schädigt die arterielle Gefäßwandstruktur (Cook und Vollrath 1995).

Eine große Rolle wird der stark vasokonstriktisch wirkenden Substanz Endothelin-1 (ET-1) zugeschrieben. ET-1 wird im Endothel, Astrozyten und Neuronen produziert (Chow et al. 2002) und entfaltet über den ET_A-Rezeptor an glatten Gefäßmuskelzellen sein konstriktives Potential (Miyachi und Masaki 1999). ET-1 kann durch freigesetztes Hämoglobin aus der arteriellen Wand freigesetzt werden (Kolias et al. 2009). Des Weiteren wird ET-1 aus aktivierten Leukozyten abgegeben (Faßbender et al. 2000). Dies ist die Folge einer diffusen Entzündungsreaktion nach stattgefundener SAB. In Liquor- und Serumproben von Patienten konnten erhöhte Spiegel einiger Adhäsionsmoleküle (Selektine, ICAM-1, VCAM-1, Integrine) nachgewiesen werden, die zu einer Anreicherung von Leukozyten in entzündeten Geweben führen. Eine Aktivierung des Komplementsystems führt zu einem schnelleren Abbau von Erythrozyten, wodurch weiteres Hämoglobin in den Liquor gelangt und eine Hochregulierung von entzündungsassoziierten Genen konnte in spastischen Arterien nachgewiesen werden (Dumont et al. 2003).

Mit den Entzündungsprozessen einhergehend scheinen auch Derivate der Arachidonsäure, wie Prostaglandine, Thromboxane (TXA₂) und Prostacycline (PGI₂) in den Pathomechanismus involviert zu sein. Während Prostaglandine und Thromboxane eine stark vasokonstriktive Wirkung aufweisen, sind Prostacycline

potente Vasodilatoren (Leslie und Watkins 1985). Ein Ungleichgewicht zwischen diesen Faktoren konnte beim zerebralen Vasospasmus nachgewiesen werden. Während der Spiegel von TXA₂ normal blieb, sank das dilatatorisch wirkende PGI₂ ab (Boullin et al. 1979). Der genaue Mechanismus dahinter ist allerdings noch ungeklärt.

Auch neurogene Faktoren haben in der Pathogenese eine Bedeutung. Der als „*denervation*“ bezeichnete Prozess beschreibt die beeinträchtigte sympathische, parasympathische und sensorische Innervation der zerebralen Arterien durch direkten Blutkontakt (Sercombe et al. 2002). Diskutiert werden ferner lokale, über den Hirnstamm gesteuerte Reflexe, die bei einem Blutungsereignis aktiviert werden und zu einer Vasokonstriktion führen (Svendgaard et al. 1992).

Zu guter Letzt führt eine SAB zu einer Reihe struktureller Veränderungen. So können morphologische Umwandlungen des arteriellen Wandaufbaus beobachtet werden (Pluta 2005). Eine Proliferation von Zellen der Arterienwand könnte die Folge von freigesetzten Faktoren aus aktivierten Thrombozyten im Liquor sein und damit zu einer Verdickung der muskulären Schichten führen (Borel et al. 2003). Nach stattgefundenem Vasospasmus findet außerdem eine Apoptose von Endothelzellen statt, was zu einer Beeinträchtigung der durch das Endothel gesteuerten Vasodilatation, z.B. durch NO führt.

Alles in allem ist der zerebrale Vasospasmus ein multifaktorielles Ereignis, das bis heute nicht komplett verstanden ist. Insgesamt scheint ein Überwiegen der konstriktiven Substanzen mit fehlender Gegenregulation und eine Schädigung des Gewebes mit Gefäßwandumbau zu Grunde zu liegen.

1.4.2 Therapiemöglichkeiten und -erfolge

Da der zerebrale Vasospasmus, wie oben beschrieben, durch ein diffuses Zusammenspiel aus vielen Faktoren entsteht, ist eine Therapie bzw. Prophylaxe schwierig und kann bis heute die Folgen nicht zufriedenstellend verhindern.

Wie unter 1.1.3 beschrieben, schreiben die Leitlinien die Gabe von 60mg Nimodipin oral alle 4 Stunden vor. Die Blockade der Ca²⁺-Kanäle soll zu einer verringerten Kontraktionsfähigkeit der glatten Gefäßmuskelzellen führen. In der Tat konnte das

Auftreten des Vasospasmus durch dieses Medikament reduziert werden (Mijailovic et al. 2013), allerdings traten als Nebenwirkungen Blutdrucksenkungen, gastrointestinale Beschwerden und Störungen in der Leber-Galle-Funktion auf (Raabe et al. 2005).

Der Einsatz von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten wie Clazosentan konnte zwar die Inzidenz von angiographisch feststellbarem Vasospasmus verringern, allerdings konnte dadurch die Prognose für Patienten nach drei Monaten nicht verbessert werden (Macdonald et al. 2007). Vasospasmen scheinen folglich nicht nur in den großen Hirnarterien aufzutreten, sondern könnten größtenteils ein Problem der Mikrozirkulation sein, die bei Angiographien oder transkraniellem Doppler-Ultraschall nicht erfasst werden.

NO-Donoren zeigten im Tierexperiment einen positiven Effekt auf die Entstehung von Vasospasmen (Pradilla et al. 2004), sind allerdings am Menschen bisher nicht getestet und deshalb in der klinischen Praxis nicht verfügbar.

Da keine suffiziente ursächliche Therapie zum aktuellen Zeitpunkt verfügbar ist, bleiben lediglich die unter 1.1.3 beschriebenen Verfahren des Volumenmanagements und der transluminalen Ballondilatation zusammen mit der Gabe von Nimodipin und engmaschiger Kontrolle bei symptomatischem Vasospasmus.

1.5 Wirkung von Nahinfrarotlicht

Das Spektrum des Nahinfrarotlichts (NIR) schließt sich direkt an das sichtbare Licht an. Seine Wellenlängen umfassen einen Bereich von 780-3000nm und schließen damit IR-A- und IR-B-Strahlung mit ein.

1.5.1 Physiologie des NO-Stoffwechsels

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein anorganisches Molekül, welches unter anderem in die Regulation des Vasotonus eingebunden ist. Wie unter 1.4.1 näher erörtert, soll es auch eine wesentliche Rolle in der Entstehung des verzögerten zerebralen Vasospasmus spielen.

Seine Synthese geht von der proteinogenen Aminosäure L-Arginin aus. In zwei oxidativen Reaktionen katalysiert die NO-Synthase die Reaktion von Arginin zu Citrullin und NO. Von der NO-Synthase sind drei Unterformen bekannt. Die neuronale (nNOS) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS) sind konstitutiv exprimiert, während die induzierbare NO-Synthase (iNOS) z.B. bei Entzündungen eine höhere Expressionsrate aufweist. Eine Aktivierung erfolgt Ca^{2+} -abhängig über Calmodulin. Da es sich beim NO um ein Radikal handelt, ist es sehr kurzlebig und wird, sofern es nicht mit anderen intrazellulären Mechanismen interagiert, mit O_2 und H_2O in Nitrit bzw. Nitrat umgewandelt (Rassow et al. 2012).

Stickstoffmonoxid besitzt viele Funktionen. Die wichtigsten davon sind Hemmung der Thrombozytenaggregation, Förderung der synaptischen Signalübertragung und Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. An dieser Stelle soll nur Letztere näher betrachtet werden. Die NO-Produktion wird über Rezeptoren durch bestimmte Substanzen, wie Acetylcholin, Bradykinin und Endothelin, aber auch durch eine erhöhte Schubspannung in den Gefäßen aktiviert. Das lokal wirksame NO diffundiert aus den Endothelzellen in die glatte Gefäßmuskelzelle und aktiviert dort die lösliche Guanylylzyklase, welche Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umwandelt. Durch cGMP wird wiederum die Proteinkinase G (PKG) in ihren aktiven Zustand versetzt, die ihrerseits die zytosolische Myosin-Leichtketten-Kinase und die Ca^{2+} -ATPase in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums phosphoryliert. Es kommt zu einer Hemmung der Myosin-Leichtketten-Kinase und damit zu einer Hemmung des kontraktile Mechanismus der Muskelzelle. Dem gegenüber wird die Ca^{2+} -ATPase aktiviert und pumpt vermehrt Kalzium in das sarkoplasmatische Retikulum. Beide Mechanismen führen zu einer Relaxation der Muskulatur und damit zu einer Vasodilatation (Rettig und Kuschinsky 2008).

Probleme in diesem Stoffwechselweg können zu Störungen der Durchblutung des betroffenen Gewebes führen. Therapeutisch wird dieses Wissen heutzutage z.B. in der Kardiologie zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit (KHK) benutzt. Durch NO-Donatoren wie Glyceroltrinitrat können verengte Koronararterien schnell dilatiert werden. Eine bessere Durchblutung und damit eine Linderung der Symptomatik sind die Folge.

1.5.2 NIR-Wirkung in Geweben

Nahinfrarotes Licht kann laut Untersuchungen in den letzten Jahren einige positive Effekte auf das bestrahlte Gewebe entfalten. Photostimulation von Myokard führte zu einer verbesserten Reperfusion in Ratten (Oron et al. 2001), die Heilungsrate von Wunden konnte gesteigert werden (Ankri et al. 2010) und es zeigte sich ein positiver Einfluss auf den Verlauf von traumatischen Hirnschädigungen (Naeser et al. 2011). Diese Effekte lassen sich durch eine geförderte Durchblutung des betroffenen Areals und damit einer besseren metabolischen Versorgung mit besseren Heilungsraten erklären. NO stellte sich als eine Möglichkeit heraus, die zu der gesteigerten Gewebepерfusion führen kann. Wie in 1.5.2 beschrieben, führt NO zu einer lokalen Vasodilatation mit höheren Blutflussraten in betroffenen Bereichen. Außerdem kann NO zur Freisetzung von verschiedenen Wachstumsfaktoren führen und auf diese Weise das Wachstum von Gefäßkollateralen begünstigen (Babaei et al. 1998, Murohara et al. 1998, Kluge et al. 1997).

Lohr et al. (2009) konnten zeigen, dass NIR-Licht NO freisetzen kann, welches vorher an Hämoglobin gebunden war. Die nitrolysierte Form des Häms entsteht unter hypoxischen Bedingungen (Lohr et al. 2009). Das Hämoglobin entfaltet dabei eine Aktivität der Stickstoffmonoxid-Reduktase und bindet das reduzierte NO an den Eisenkern des Häms (Gladwin et al. 2006, Hendgen-Cotta et al. 2008). Das Hämoglobin fungiert so als NO-Speicher und potentielle Quelle. Da NO ein potenter Vasodilatator ist und bei der pathophysiologischen Entstehung des Vasospasmus vermindert vorkommt, könnte durch Freisetzung dieses Gasotransmitters dieser Komplikation entgegengewirkt werden.

2. Ziele der Arbeit

Der zerebrale Vasospasmus als eine der schwerwiegendsten Komplikationen der SAB ist in seiner Pathogenese nicht vollkommen verstanden. Eine suffiziente kausale Therapie fehlt deshalb bisher. Die Möglichkeit, dass oxidative Abbauprodukte des Hämoglobins in diesen Mechanismus durch Inhibition des BK-Kanals involviert sind, gewinnt in den letzten Jahren mehr und mehr an Evidenz. Doch auch hier gibt es noch viele Teilaspekte, die untersucht werden müssen, um den Einfluss der HDPs bei der Entstehung des Krankheitsbilds zu verstehen.

Unklar ist noch, in welchen Konzentrationen verschiedene HDPs wirksam sind. Verglichen mit der im Patienten vorkommenden Konzentration könnte so die Einflussgröße auf den Vasospasmus untersucht werden. Des Weiteren gibt es einige HDPs, deren Effekt noch nicht untersucht wurde. Die PDPs als Intermediate des Stoffwechselweges konnten zwar im Gemisch eine Kontraktion hervorrufen, allerdings ist der Effekt der Einzelisomere noch unbekannt. Mögliche Unterschiede in der Wirkstärke könnten den Fokus schärfen. Aber auch neu entdeckte Abbauprodukte, wie BOX C sind bisher noch nicht hinreichend untersucht worden, sodass auch hier das konstriktive Potential und sein Einfluss abgeschätzt werden kann.

Ein weiteres Augenmerk lag auf möglichen Therapieansätzen. Zum einen wurde auf dem Vorwissen, dass eine Bestrahlung der HDPs eine Konfigurationsänderung von der *Z*- in die *E*-Konfiguration bewirkt, eine mögliche Änderung der Vasoaktivität untersucht. Zum anderen stand der Effekt von Nahinfrarotlicht auf die arterioläre Gefäßweite im Mittelpunkt. Hier wird in der Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), einem potenten Vasodilatator, ein möglicher Therapieansatz zur Verhinderung des Vasospasmus gesehen.

Aus dem Genannten ergaben sich drei Arbeitshypothesen der Arbeit:

- „Die infolge einer Subarachnoidalblutung entstehenden Hämoglobinabbauprodukte (PDPs und BOXes) tragen über die Inhibition von BK-Kanälen, abhängig von ihrer Konzentration, zur Verringerung des Durchmessers in zerebralen Arteriolen bei.“
- „Die Umwandlung in *E*-konfigurierte HDP-Isomere senkt deren vasokonstriktorische Wirkung auf Arteriolen.“

- „Die Bestrahlung von Arteriolen mit Nahinfrarotlicht führt zu einer Vasodilatation.“

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden akute Hirnschnitte von C57BL/6J-, Slo1-Wildtyp (WT)- und Slo1- Knockout (KO)-Mäusen verwendet. In letzteren wird der BK-Kanal nicht funktionsfähig exprimiert.

Neue Jungtiere entstanden aus Verpaarungen von Wildtypen bzw. heterozygoten Tieren (Slo1 ^{+/-}) mit durchschnittlich acht Nachkommen pro Wurf. Da die männlichen KO-Mäuse fortpflanzungsunfähig sind, scheiden sie für den Zuchterhalt aus. Das Absetzen von den Elterntieren erfolgte zwischen der vierten und fünften Lebenswoche. Zur Unterscheidung des genetischen Hintergrunds wurde in der zweiten Woche nach der Geburt eine Genotypisierung mittels PCR einer Schwanzbiopsie vorgenommen. Als weiteres Unterscheidungsmerkmal diene zusätzlich der Phänotyp der Knockout-Mäuse, welcher sich deutlich vom WT unterscheidet.

So zeigen die KO-Mäuse Symptome einer zerebellaren Dysfunktion mit Ataxie, Intentionstremor, abnormaler Lokomotion und eingeschränkter motorischer Lernfähigkeit. Des Weiteren weisen sie eine anfängliche Wachstumsretardierung bis zur 12. Woche, erhöhten Blutdruck, Harnblasenhyperaktivität und progressiven Hörverlust auf (Sausbier et al. 2004). Die ebenfalls verzögerte Augenöffnung wurde Anfang der dritten Lebenswoche manuell mithilfe eines Stieltupfers und isotonischer Kochsalzlösung unterstützt. Die Lebenserwartung ist im Vergleich mit den WT-Mäusen nicht eingeschränkt.

Für die Experimente wurden Mäuse in einer Altersspanne von 20-31 Tagen ohne Geschlechtspräferenz verwendet. In dieser Zeit sind die zerebralen Gefäße bereits gut entwickelt, die Schädeldecke allerdings noch nicht vollständig verknöchert, sodass die präparative Entnahme erleichtert ist.

Die Tiere wurden in der ZET Lobeda (Zentrale Experimentelle Tierhaltung, Forschungszentrum Lobeda, Am Klinikum 1, 07747 Jena) in vollklimatisierten Räumen mit frei verfügbarem Zugang zu Wasser und Trockenfutter gehalten, gezüchtet und täglich von einem angestellten Tierpfleger begutachtet. In den Haltungsräumen wurde ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus (14h / 10h) eingehalten

und die Beleuchtung auf unter 60 lux herabgeregelt, um Netzhautschäden bei den albinotischen Tieren vorzubeugen.

Die Legitimation der Organentnahmen erfolgte gemäß der Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken nach §1 und §4 (3) TierSchG. Die Anästhesie und Präparation zur Hirnentnahme wurden von einem sachkundigen Mitarbeiter durchgeführt. Jedes für ein Experiment benutzte Tier wurde protokolliert, dokumentiert und von der Tierhaltung mit einem Tieridentifikationscode versehen, sodass eine genaue Zuordnung möglich ist.

3.2 Genotypisierung

Neben der oben genannten Genotypisierung der Mäuse in der zweiten Lebenswoche, wurde eine weitere Nachgenotypisierung postexperimentell durchgeführt, um fälschlicherweise verwendete heterozygote Tiere auszuschließen. Beide Genotypisierungen folgten demselben Protokoll.

Dazu musste zunächst die DNA aus der Schwanzbiopsie isoliert werden. Die Biopsie wurde mit 180µl ATL (tissue lysis buffer) und 20µl Proteinkinase K versetzt. Das Gemisch inkubierte danach bei 56°C und 300 rpm für mindestens 1-3h in einer Zentrifuge. Es folgte die Zugabe von 200µl AL (lysis buffer) und 200µl absolutem Ethanol, um die Lysereaktion durch Proteinkinase K zu stoppen.

Das Lysat wurde auf eine Trennsäule (Quiagen DNA Isolation Kit) pipettiert und für eine Minute bei 8000xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Um die Reinheit der DNA zu gewähren, wurde die Säule zweimal mit 500µl AW (*wash buffer*) in der Zentrifuge durchgespült und auch dieser Durchfluss verworfen.

Die Elution der DNA aus der Säule fand mithilfe von 20µl AE (*elution buffer*) in der Zentrifuge für eine Minute bei 8000xg statt. Der Vorgang wurde wiederholt und das gewonnene Eluat bei 4°C gelagert.

Für die folgende PCR wurden pro aufgereinigter Probe zwei Ansätze hergestellt, da sich die Primer für Slo1 WT und KO bei der Reaktion gegenseitig behindern würden.

Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Stoff	WT	KO
<i>Gibco Wasser (Quiagen)</i>	2,7	2,7
<i>5x Q-Buffer (Quiagen)</i>	2	2
<i>10x Puffer (Quiagen)</i>	1	1
<i>2,5 mM dNTPs (Quiagen)</i>	0,2	0,2
<i>Primer Neo 5'</i>	-	0,5
<i>Primer RA 14025 3'</i>	-	0,5
<i>Primer Exon1 5'</i>	0,5	-
<i>Primer WT 3'</i>	0,5	-
<i>Taq-Polymerase (Quiagen)</i>	0,1	0,1

Tab.2: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für WT und KO; Angaben in µl

Die verwendeten Primer hatten folgende Sequenz:

- Neo: 5'-ATAGCCTGAAGAACGAGATCAGC-3'
- RA 14025: 3'-CCTCAAGAAGGGGACTCTAAAC-5'
- Exon1: 5'-TTCATCATCTTGCTCTGGCGGACG-3'
- WT: 3'-CCATAGTCACCAATAGCCC-5'

Zu jedem Ansatz wurden 3µl der DNA-Probe hinzugegeben.

Die PCR wurde in einem Thermozykler (Biometra TRIO 48, Biometra GmbH, Göttingen) mit folgendem thermischen Ablauf durchgeführt:

1.)	94°C	2min
2.)	94°C	30s
3.)	55°C	30s
4.)	68°C	2min (15x wdh. ab (2))
5.)	94°C	30s
6.)	50°C	30s
7.)	68°C	2min (30x wdh. ab (5))
8.)	72°C	5min
9.)	4°C	Pause

Tab.3: Thermischer Ablauf der PCR im Biometra TRIO 48

Durch anschließende Gelelektrophorese mit QIAxcel Advanced (Quiagen) wurden die Ergebnisse der PCR sichtbar gemacht. Als Kartusche wurde das QIAxcel DNA Screening Kit 2400 (Quiagen) verwandt (Abb. 5). Dabei wurden die beiden

getrennten Reaktionsansätze einer Biopsie-Probe nach stattgefundener PCR für die Gelelektrophorese wiedervereignet. In Abbildung 5 kann man den Unterschied zwischen Wildtypen (1) - (6), einem Knockout- (7) und einem heterozygoten Tier (8) erkennen.

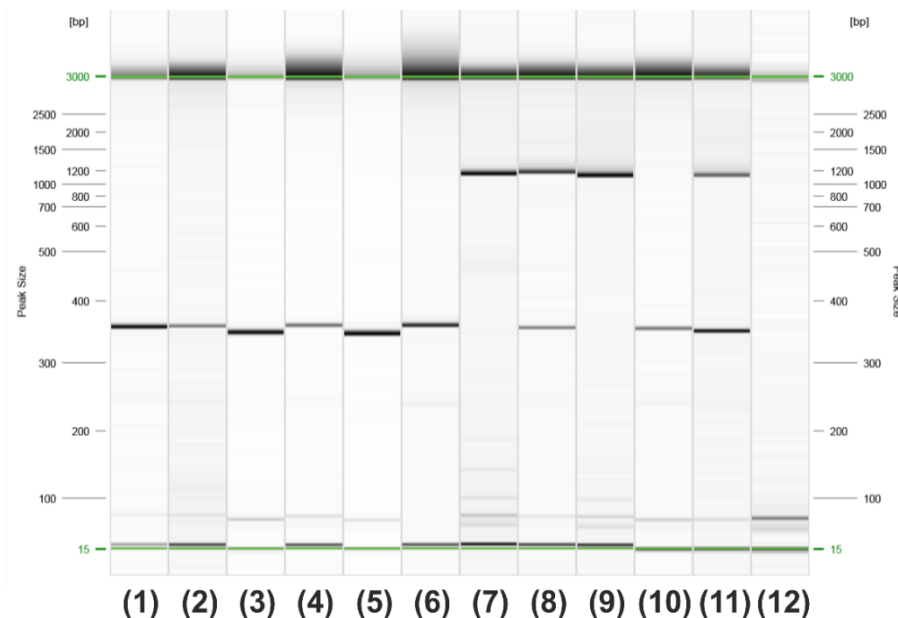


Abb.5: Beispielbild einer Gelelektrophorese mit dem Ergebnis von acht Biopsien (1) - (8) und den vier Kontrollen KO (9), WT (10), heterozygot (11) und Wasser (12); WT-Bande: 332bp; KO Bande: 1000 bp; Proben (1) – (6) zeigen das Ergebnis für WT-, Probe (7) für KO- und Probe (8) für heterozygote Mäuse.

3.3 Lösungen

3.3.1 aCSF-Lösungen

Sowohl für die Präparation des Maushirns, als auch für die Messungen mit einem Mikroskop mit differentiellm Interferenz-Kontrast (DIC), wurde eine aCSF-Lösung (artificial cerebrospinal fluid) benötigt. Die Ionenzusammensetzung ahmt die des Liquors nach und soll einerseits alle physiologischen Funktionen der Zelle sicherstellen und andererseits als pH-Puffer fungieren. Auf diese Weise blieben die Hirnschnitte für ca. 4-6h vital.

Zum Ansetzen der Lösungen wurde zunächst eine 10-fach konzentrierte aCSF-Stammlösung hergestellt. Dazu wurden folgende Salze (Tab.4) in einem Liter doppelt destillierten Wasser (ddH₂O) gelöst.

Stoff	Konzentration (in mM)	Masse _{1000ml} (in g)	Firma
NaCl	1250	73,050	Carl Roth GmbH & Co. KG
KCl	40	2,982	Merck KGaG
NaHCO₃	250	21,003	Merck KGaG
NaH₂PO₄	12,5	1,725	Merck KGaG

Tab.4: Zusammensetzung der aCSF-Stammlösung. Angaben beziehen sich auf 1000ml Endvolumen

Zusätzlich zu der aCSF-Stammlösung wurde 1M CaCl₂-, 1M MgCl₂- und 2M Glukose-Stammlösung benötigt. Der jeweilige Stoff wurde in der angegebenen Menge (Tab.5) in 100ml ddH₂O gelöst.

Stoff	Konzentration (in M)	Masse _{100ml} (in g)	Firma
CaCl₂	1	14,702	Merck KGaG
MgCl₂	1	20,330	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glukose	21	39,634	Carl Roth GmbH & Co. KG

Tab.5: Zusammensetzung der CaCl₂-, MgCl₂- und Glukose-Stammlösung. Angaben beziehen sich auf 100ml Endvolumen

Alle Lösungen wurden im Kühlschrank bei +4°C in verschließbaren Schraubgefäßen aufbewahrt.

Für jedes Experiment wurden frisch zwei unterschiedliche aCSF-Lösungen angesetzt. Dazu wurden die oben beschriebenen Stammlösungen in bestimmten Verhältnissen zusammengegeben (Tab.6) und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen

von 500ml (Präparationslösung) bzw. 1000ml (Mess- und Aufbewahrungslösung) verdünnt.

Stoff	Präparationslösung (500ml)		Messlösung (1000ml)	
	Konzentration (mM)	Menge (ml)	Konzentration (mM)	Menge (ml)
NaCl	125	50	125	50
KCl	4		4	
NaHCO₃	25		25	
NaH₂PO₄	1,25		1,25	
CaCl₂	0,5	0,25	2	2
MgCl₂	6	3	1	1
Glukose	10	2,5	10	5

Tab.6: Zusammensetzung der Präparations- und Messlösung

Die Präparationslösung wurde im Anschluss mit Eis auf 4°C abgekühlt. Von der Messlösung wurden 200ml abgefüllt und bei Raumtemperatur zur Aufbewahrung der Hirnschnitte gelagert. Die Messlösung (800ml) wurde in einem Wasserbad auf eine annähernd physiologische Temperatur von 35°C gewärmt. Während der Messung am Mikroskop befand sich der Hirnschnitt in kontinuierlicher Perfusion mit dieser Lösung.

Die Lösungen wurden über den gesamten Experimentierzeitraum mit Carbogen (95% O₂; 5% CO₂) begast und zu Beginn auf einen physiologischen pH-Wert von 7,40 mit 1M NaOH bzw. 2M HCl eingestellt.

Der Unterschied in den Calcium- und Magnesiumkonzentrationen zwischen der Präparations- und Messlösung begründet sich durch eine geringere neuronale Erregbarkeit während der Hirnschnittherstellung.

3.3.2 Injektionslösung (EC-Lösung)

Für die Injektion des Fluoreszenzfarbstoffs DAF-FM-DA in einen Hirnschnitt wurde eine spezielle HEPES(2-[4-[2-Hydroxyethyl]-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure)-gepufferte Lösung hergestellt. Diese enthielt 150mM NaCl, 2,5mM KCl und 10mM HEPES (Carl Roth GmbH & Co. KG) in doppelt destilliertem Wasser. Darauf wurde der pH-Wert auf ein physiologisches Niveau von 7,40 mittels 1M NaOH gebracht und bei +4°C gelagert.

3.4 Substanzen

3.4.1 L-NAME

Die Substanz L-NAME (L-Nitro-Arginin-Methyl-Ester) ist ein Inhibitor der neuronalen und endothelialen NO-Synthase (Pfeiffer et al. 1996). Durch geringere Synthese des vasodilatatorisch wirkenden Stickstoffmonoxids (NO) erhöht sich der Ruhetonus glatter Muskelzellen.

Das Pharmakon kam in den Experimenten zum Einsatz, da im verwendeten Hirnschnitt-Modell ein physiologisch vorhandener Blutdruck fehlt, weshalb die Gefäße in ihren relaxierten Zustand übergehen. Das durch L-NAME hervorgerufene NO-Defizit induziert eine Vorspannung der Arteriolen, die den physiologischen Gefäßwandtonus unter Blutdruck simulieren soll.

Verwendet wurde in allen Versuchen eine Konzentration von 100µM. Dafür wurden 5,4mg L-NAME (Sigma-Aldrich Co.) in 200ml aCSF gelöst.

L-NAME wurde im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

3.4.2 Propentdyopents (PDPs)

Im Fokus der Arbeit stehen die Propentdyopents (PDPs) und ihre vasogenen Effekte im Hirn. PDPs sind Intermediate des oxidativen Abbaus des Bilirubins und direkte Vorstufen der Bilirubin-Oxidations-Endprodukte (BOXes).

Die Substanzen wurden durch Marcel Ritter vom Institut für Anorganische und Analytische Chemie Jena (IAAC) aufgereinigt und bereitgestellt.

Die Gewinnung der Intermediate gelang über Degradation von Bilirubin. Zunächst wurden dafür 5g Bilirubin (8,6mmol) für 24h in 2,5l 5M NaOH suspendiert. Es folgte eine Einstellung des pH-Wertes auf 7,5 mittels konzentrierter HCl und anschließend innerhalb von vier Stunden die Zugabe von 50%iger H₂O₂-Lösung bis eine finale Konzentration von 1% erreicht wurde. Das entstandene Gemisch wurde für weitere 20h gerührt. Um die, bei diesem Prozess durch Oxidation entstandenen, Abbauprodukte vom Hämoglobin zu isolieren, wurden die BOXes durch Zugabe von Chloroform extrahiert. Die übriggebliebene wässrige Phase enthielt die PDPs, welche daraufhin mit Festphasenextraktion (*hydrophilic lipophilic balanced Kartuschen*) weiter aufgereinigt wurden. Nach dem Auftragen der wässrigen Phase der Chloroform-Extraktion wurde mit Wasser gewaschen und mit 20% Acetonitril/Wasser wurden die Intermediate eluiert. Anschließend fanden die Trocknung in einer Vakuum-Zentrifuge und die Isolation der Einzelisomere durch präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) (Shimadzu LC-8A) mit einer HTEC C18-Säule (5µm, 250x16mm, Mackerey-Nagel) und SPD-10AV UV/Vis-Detektion bei 280nm statt. Aufgrund rascher Isomerisierung der Einzelisomere zu ihrem jeweiligen Konstitutionsisomer war ein direktes Gefrieren der HPLC-Fractionen mit flüssigem Stickstoff (-196°C) notwendig. In einem letzten Schritt wurden die gewonnenen Proben ein weiteres Mal getrocknet und waren in diesem Zustand stabil, sodass die Einzelisomere in gewünschter Reinheit isoliert werden konnten. Zur Verwendung im Experiment konnten die vier Isomere in den gewünschten Mengen gemischt werden.

Gelagert wurden die PDPs im Kühlschrank bei +4°C in lichtgeschützten Reaktionsgefäßen, von denen jedes bereits eine abgewogene Menge zur Herstellung der Lösungen in verschiedenen Konzentrationen beinhaltete. Dies wurde erreicht durch Zugabe von jeweils 30ml aCSF, in der bereits 5,4mg L-NAME gelöst waren.

Folgende Varianten wurden in dieser Arbeit untersucht:

- Z-PDP A1/A2/B1/B2 *deg* Einzelisomere mit je 5µM
- Z-PDP A1+A2 *deg* Isomerpaar mit 5 / 0,5 / 0,05µM

3.4.3 Z-BOX A *syn*

Für eine noch ausstehende Konzentrationsreihe mit BOX A (Bilirubin-Oxidations-Endprodukt A) wurde dies durch Daniel Schulze (IAAC) synthetisiert, von Marcel Ritter abgewogen und in lichtgeschützte Reaktionsgefäße abgefüllt. Eine Herstellung der Lösung erfolgte äquivalent zu den PDPs durch Zugabe von 30ml aCSF (+L-NAME).

Bereitgestellt wurden folgende Varianten von BOX A:

- Z-BOX A *syn* mit je 5 / 0,5 / 0,05 μM

Im Gegensatz zu den PDPs wurde BOX A nicht aus degradiertem Bilirubin gewonnen, sondern in einem chemischen Syntheseprozess hergestellt. Die Synthese erfolgte dabei zu einem Teil durch die Firma Laborchemie Apolda GmbH und zum anderen Teil durch Daniel Schulze (IAAC) unter Leitung von Prof. Dr. Matthias Westerhausen.

Als Ausgangsprodukt dient 3-Bromo-4-methylfuran-2,5-dion, welches durch vier bis sechs Schritte, in denen u.a. Vinylierungen und Ringtransformationen vorgenommen werden, zu dem Produkt Z-BOX A *syn* reagiert (Abb.6). Der synthetische Weg hat den Vorteil, einen höheren Ertrag an BOX A zu erzielen im Vergleich mit dem durch Abbau gewonnenen Äquivalent.

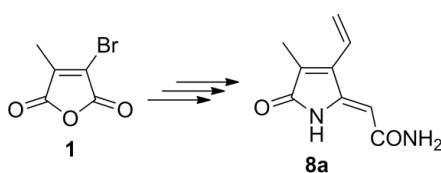


Abb.6: Zusammenfassende schematische Darstellung des chemischen BOX A-Syntheseweges von der Ausgangssubstanz 3-Bromo-4-methylfuran-2,5-dion (1) zum Endprodukt Z-BOX A (8a) (aus Klopffleisch et al. 2013).

3.4.4 *E*-BOX A syn

E-BOX A ist das *trans*-Isomer des Abbauproduktes Z-BOX A und wurde durch Marcel Ritter (IAAC) aus diesem hergestellt. Dazu wird mit Acetonitril suspendiertes Z-BOX A für 12 Minuten mit einer Xenon-Lampe bestrahlt. Nach diesem Vorgang finden sich in der Lösung sowohl *E*- als auch Z-BOX A ungefähr im Verhältnis 50/50. Teilweise findet während dieses Prozesses die Photodegradation der BOXes statt. Mittels präparativer HPLC-UV konnten die *E*-Isomere aus dem Gemisch isoliert werden.

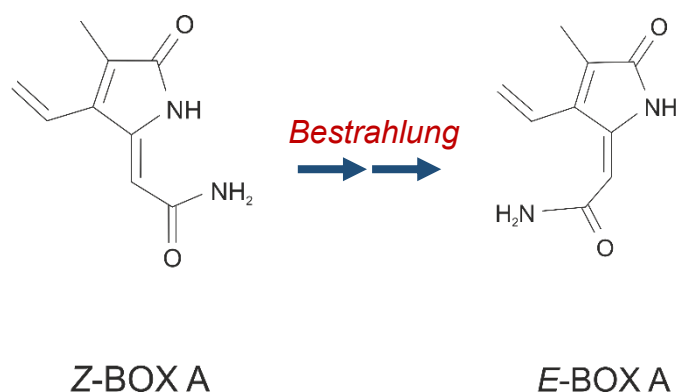


Abb.7: Zusammenfassende Darstellung der *E*-BOX A Isolierung durch Bestrahlung von Z-BOX A und anschließende HPLC-UV-Aufreinigung

Bereitgestellt wurde folgende Variante:

- *E*-BOX A syn mit 5 μ M

Die erhaltene Substanz war bereits abgewogen und erreichte unter Zugabe von 30ml aCSF-L-NAME-Lösung die oben angegebene Konzentration von 5 μ M.

3.4.5 Z-BOX C deg

Das vor kurzem entdeckte Z-BOX C deg entsteht beim oxidativen Abbau von Bilirubin mit Wasserstoffperoxid. Mittels HPLC konnte die Substanz aus der H₂O-Fraktion der Festphasenextraktion, die beim Abbau entsteht, isoliert werden.

Bereitgestellt wurde folgende Variante:

- Z-BOX C deg mit 5µM

Die erhaltene Substanz war bereits abgewogen und erreichte unter Zugabe von 30ml aCSF-L-NAME-Lösung die oben angegebene Konzentration von 5µM.

3.4.6 DAF-FM-DA

Der Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM-DA (4-Amino-5-Methymino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetat; Thermo Fisher Scientific) ermöglicht den Nachweis von Stickstoffmonoxid im Gewebe. Dabei wird das Molekül intrazellulär durch Esterasen gespalten und in seine aktive Form versetzt. Durch Bindung von NO erhöht sich die Fluoreszenzintensität. Das vom Hersteller angegebene Exzitations-/Emissionsmaximum liegt bei 495/515nm. Im Experiment fand eine Anregung mit einem Laser (Coherent Sapphire CDRH LP) bei einer Wellenlänge von 488nm statt. Für die 5mM DAF-FM-DA Stammlösung wurden 50µg in 20µl reinem DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma-Aldrich) gelöst und zweimal für je 30 Sekunden gevortext, ins Ultraschallbad gestellt und zentrifugiert. Von dieser Lösung wurde daraufhin 1µl entnommen und mit 100µl der EC-Lösung verdünnt, sodass eine Endkonzentration von 50µM entstand. Durch das zugesetzte HEPES konnte der stark alkalische pH-Wert des DMSO abgepuffert werden, sodass keine Schädigung des Gewebes zu erwarten ist. Die anschließende Filterung (MILLEX®-GV, 0,22µm Porengröße) stellte sicher, dass keine in der Lösung verbliebenen Partikel die für die Injektion verwendete 4MΩ-Glaspipette verstopfen.

3.5 Hirnschnittpräparation

Nach tiefer Anästhesie mit Isofluran erfolgte die rasche Dekapitation des Tieres mit einer chirurgischen Schere, durchgeführt durch fachkundiges Personal mit anerkannter Berufsausbildung (Biologe, Arzt, Biologisch-technischer Assistent) und gültigem Sachkundenachweis (FELASA B). Das Fell mitsamt der Kopfhaut wurde auf dem Neurokranium bis auf Höhe der Augen entfernt. Mithilfe einer spitzen Pinzette wurde der Schädel durch die Orbitae fixiert und in eine Präparationsschale überführt, welche mit der eisgekühlten Präparationslösung befüllt wurde.

Unter Zuhilfenahme eines OP-Stereomikroskops wurde die Schädelkalotte eröffnet: Mit einer Federschere wurde der Schädelknorpel im Os occipitale unmittelbar kaudal der Lambda-Naht eingestochen und entlang des Sutura sagitalis aufgeschnitten. Am vorderen Schnittpunkt wurden zu beiden Seiten an der Sutura coronalis seitliche Einschnitte gemacht, ebenso im Bereich der Sutura lambdoidea, um so ein laterales Aufklappen der Parietal- und Okzipitalplatten zu ermöglichen und das Hirn freizulegen.

Das Zerebellum, sowie der präfrontale Kortex und der Riechkolben wurden mithilfe eines Skalpells abgetrennt und das Hirn auf einem gebogenen Spatel aus dem Schädel entnommen. Die leicht angeschrägte Frontalseite wurde mit Sekundenkleber (UHU) auf dem Probenteller befestigt und in die ebenfalls mit eisgekühlter Präparationslösung gefüllte Schneidekammer eines Vibratoms (Leica VT1200S, Leica Biosystems, Nussloch) überführt. Hier konnten nun koronale Hirnschnitte mit einer Dicke von 350µm hergestellt werden. Dabei hatte die eingespannte Rasierklinge eine Vorschubgeschwindigkeit von 0,12mm/s und eine Schwingungsamplitude von 1mm, um eine mögliche Scherkraftentwicklung möglichst gering zu halten und das Gewebe einer geringen Belastung auszusetzen. Vor der mikroskopischen Messung mussten die Schnitte für mindestens 30 Minuten in aCSF-Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, um sich an die neue Ionenzusammensetzung und Temperatur der aCSF-Messlösung anpassen zu können.

3.6 Mikroskopie

3.6.1 DIC-Mikroskopie

Die Bilder wurden akquiriert durch DIC-Mikroskopie (differential interference contrast) an einem Nikon Eclipse FN1 Mikroskop. Durch eine CCD-Kamera (Hamamatsu) und einem zwischengeschalteten Analog-Digital-Converter (ADC) war es möglich, die Bilder in digitaler Form aufzunehmen. Diese wurde durch die Software iuVCR bzw. ViewCreator Pro X64 (ADLINK Technology, Inc.) angesteuert. Das verwendete Wasserimmersionsobjektiv weist dabei folgende optische Eigenschaften auf:

- Hersteller: Nikon
- Numerische Apertur: 0,80
- Vergrößerung: 16x
- Arbeitsabstand: 3,0mm (LWD)

Außerdem ist das Objektiv unendlich korrigiert und besitzt ein N2 Kondensorprisma. Es eignet sich für die DIC-Mikroskopie.

Diese ermöglicht durch Nutzung der optischen Dichte des Präparats eine kontrastreiche und plastische Darstellung der Gefäße und des perivaskulären Neuropils mit den Zellsomata der Neuronen (Abb. 8). Für die Messung vorteilhaft ist die bessere Abgrenzbarkeit der Gefäßwand vom Lumen. Die DIC-Mikroskopie nutzt einen Polarisationsfilter und ein Wollaston Prisma, um das eintreffende Licht in zwei senkrecht zueinander polarisierte Teilstrahlen aufzuteilen. Diese treffen nach Brechung durch die Kondensorlinse auf das Präparat und es entstehen Phasenverzögerungen, die sich aus den unterschiedlichen optischen Brechungseigenschaften innerhalb des Präparats ergeben. Nach der Objektivlinse treffen die zwei Teilstrahlen auf ein weiteres Prisma, welches beide wieder zu einem Strahl zusammenfügt. Die vorhandenen Phasendifferenzen modulieren dabei die Amplitude der Welle. Durch einen weiteren Polarisator werden Lichtanteile, die keine Phasenverzögerung erfahren haben gefiltert.

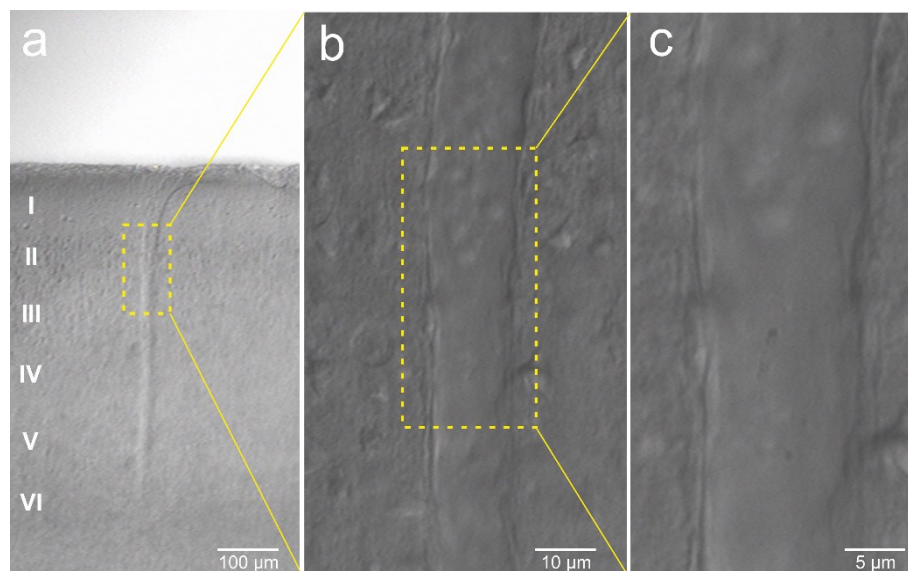


Abb.8: DIC-Bilder einer penetrierenden Arteriole in drei Vergrößerungsstufen. **(a)** Übersichtsaufnahme; die durch die sechs Schichten des Neocortex ziehende penetrierende Arteriole entspringt aus einer pialen Arteriole. **(b)** Vergrößerung der Arteriole in Schicht II/III des Cortex **(c)** Arteriole in der endgültigen Vergrößerungsstufe, in der die Durchmesserberechnung vorgenommen wurde.

3.6.2 Konfokale Mikroskopie/Fluoreszenzdetektion

Untersuchungen zum NO-Nachweis mittels des Fluoreszenzfarbstoffs DAF-FM-DA wurden mithilfe der konfokalen Mikroskopie mit einer Spinning Disc (Yokogawa CSU10) an einem Nikon FN1-Mikroskop durchgeführt. Verwendet wurde ein 40x Wasserimmersionsobjektiv (Nikon NIR Apo; numerische Apertur: 0,80; Arbeitsabstand: 3,5mm), welches unendlich korrigiert war.

Die Anregung des Farbstoffs fand durch einen 488nm-Laser (Coherent Inc., Sapphire CDRH LP) mit Intensitätsmodulation durch einen akustooptischen Modulator (AOTF, BFi Optilas) und einen regelbaren Intensitätsfilter (30%) statt. Eine CCD-Kamera (Rolera XR, QImaging, Surrey, Kanada), gesteuert durch die Software WinFluor, nahm die Bildsequenzen bei einer Emission von 515nm auf (Expositionszeit 4000ms, Gain 5x, Binning 2).

3.7 Versuchsdesign

3.7.1 Einwaschung der HDPs

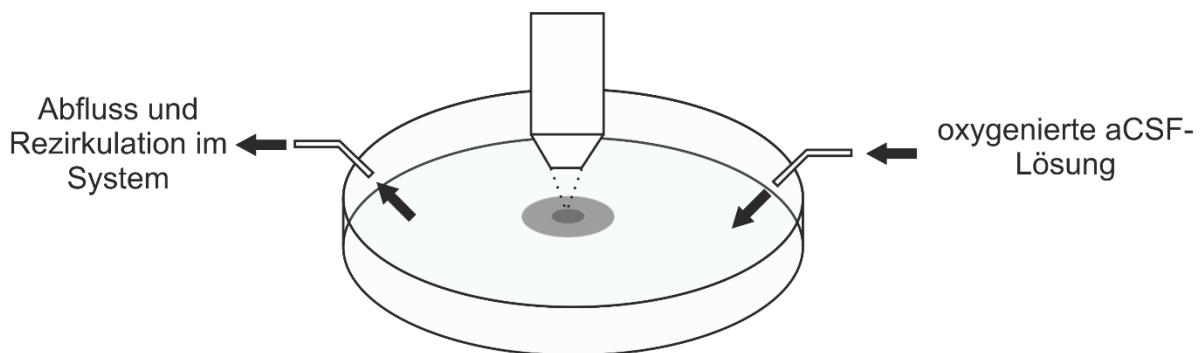


Abb.9: Schematische Darstellung der Mikroskopiekammer; Der Hirnschnitt wird über die gesamte Experimentierzeit mit oxygenierter aCSF-Lösung umspült, die wieder aus der Kammer abgepumpt wird und in einer Rezirkulation in das Vorratsgefäß zurückfließt. Eingewaschene Substanzen gelangen ebenfalls über die Zirkulation zum Hirnschnitt.

Die verwendeten Hämabbauprodukte wurden nach einem standardisierten Zeitplan zum Hirnschnitt gegeben. Dies erfolgte über ein Schlauchsystem aus Polyacrylschläuchen, in denen mit Hilfe einer Peristaltikpumpe die Lösungen in die Mikroskopiekammer herein- und herausgeleitet wurden (Abb. 9).

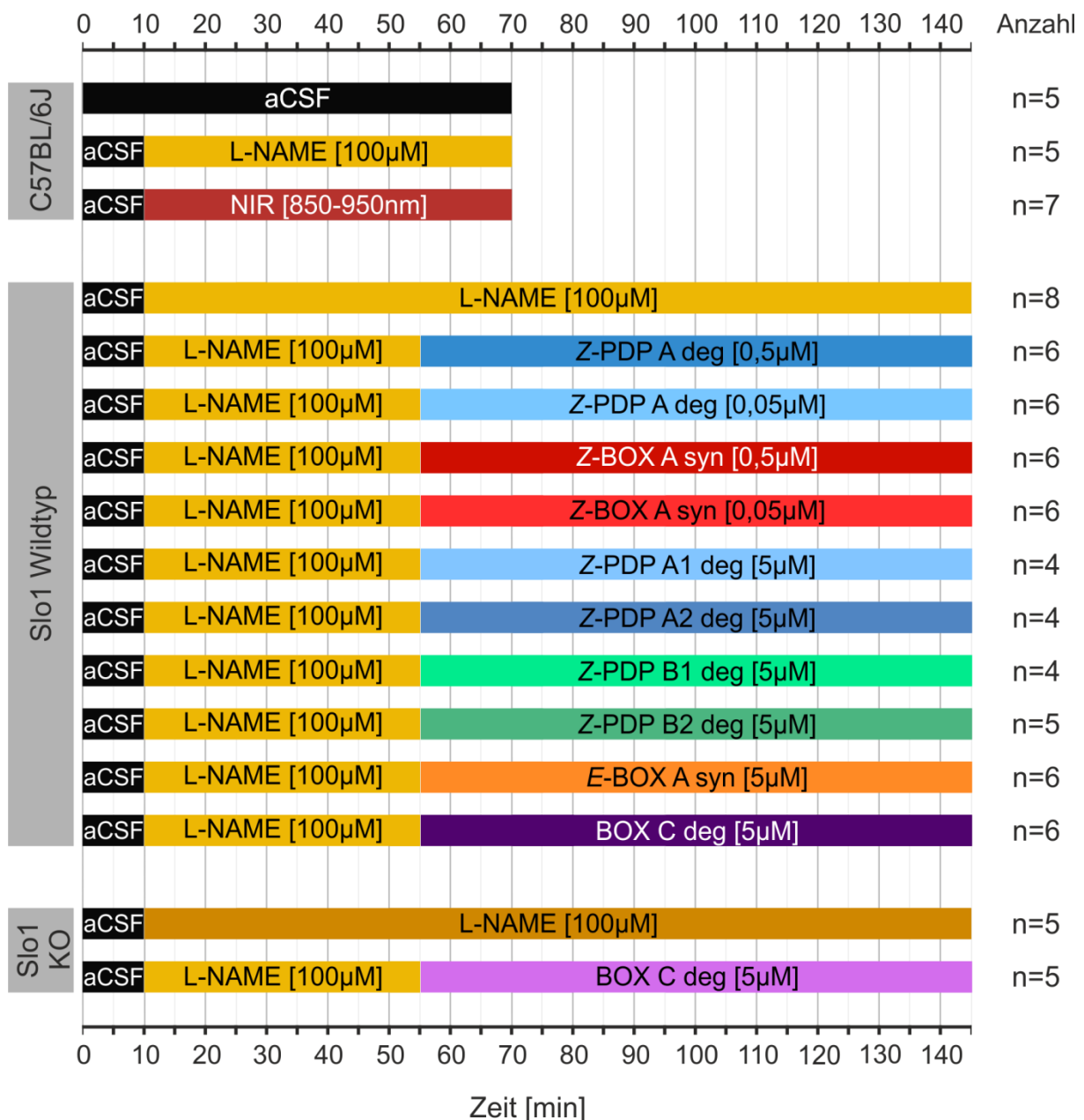


Abb.10: Schematische Darstellung des experimentellen Designs mit standardisierten Einwaschzeiten geordnet nach den verwendeten Mauslinien C57BL/6J, Slo1 WT und Slo1 KO. Jedem Experiment geht ein anfängliches Intervall mit 10-minütiger aCSF-Perfusion voraus. Bei Substanzeinwaschung folgt eine 45-minütige Periode, in der L-NAME [100µM] zur Vorspannung hinzugefügt wird. Die Testsubstanz wird im Anschluss in der jeweiligen Konzentration für weitere 90 Minuten eingewaschen. Bei C57BL/6J-Mäusen folgte nach der 10-minütigen aCSF-Phase direkt die vasoaktive Intervention für 60 Minuten. Am rechten Rand wird jeweils die Anzahl der durchgeführten Versuche gezeigt.

Alle Experimente starteten mit einer 10-minütigen Baseline-Periode, um eine Stabilität des Gefäßdurchmessers in Ruhe zu gewährleisten, sodass die Vasoaktivität der eingewaschenen Substanzen nicht durch spontane Änderungen des arteriölen Durchmessers überlagert wird. Experimente, die schon in dieser Zeit eine starke Kontraktion oder Dilatation zeigten ($>10\%$ innerhalb von 10min) wurden von der Auswertung ausgeschlossen. In allen Versuchen, in denen mit HDPs gearbeitet wurde, erfolgte die Einwaschung der L-NAME-Lösung über 45 Minuten zur Vorspannung der Arteriolen. Die letzten drei Messpunkte (Minute 45-55) dienten dabei als Baseline für die später gemessene Kontraktion der Arteriole durch das HDP-Isomer. Die gelösten Propentdyopents bzw. BOXes wurden für jeweils 90 Minuten unter kontinuierlicher Perfusion appliziert.

Zu definierten Zeitpunkten nach 0, 30, 60 und 90 Minuten Einwaschzeit wurde jeweils eine Probe ($\sim 500\mu\text{L}$) der HDP-Lösung entnommen, bei -20°C gefroren und gelagert. Proben, die E-BOX A enthielten, wurden bei -80°C gelagert, um die Gefahr einer Rückisomerisierung zum Z-Isomer so gering wie möglich zu halten. Die Proben dienten der Nachanalyse durch die analytische Chemie.

Alle Experimente, in denen HDPs verwendet wurden, wurden unter Lichtausschluss durchgeführt, um diese vor Abbauprozessen zu schützen.

Im Falle der PDP-Einzelisomere wurde ein verblindetes Versuchsdesign gewählt, sodass dem Experimentator nicht bekannt war, um welches Isomer es sich handelt.

Um eine bessere Aussage über die Ergebnisse der HDP-Versuche zu treffen, wurde außerdem L-NAME über den gesamten Messzeitraum von 135 Minuten eingewaschen, um mögliche Effektüberlagerungen mit den Abbauprodukten besser bewerten zu können. Diese Versuchsreihe bildet die Kontrollgruppe, mit der die vasoaktiven Effekte der HDPs statistisch verglichen wurden.

Am Ende jedes Experiments war es wichtig zu überprüfen, ob der Hirnschnitt noch vital ist, die Gefäße somit fähig zur Kontraktion waren. Dies gelang über die Zugabe von $5\mu\text{L}$ einer Noradrenalin-Lösung (1mg/ml) direkt in die Messkammer. Löste der Vasokonstriktor Noradrenalin (NA) eine weitere Gefäßverengung aus, wurde die Kontrolle als positiv bewertet. Versuche mit einem negativen Ergebnis, d.h. Dilatationen oder kein Effekt unter NA wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Weitere Ausschlusskriterien waren:

- Schwellung des Schnittes während des Experiments
- Verletzung des Gewebes während der Präparation
- Unterbrechungen der Perfusion bzw. Carbogen-Begasung
- Falscher Genotyp in der Nachgenotypisierung
- Dilatation über 10% bei L-NAME-Einwaschung
- Ungewünschte Isomerisierung der HDPs

3.7.2 Infrarot-Bestrahlung des Hirnschnitts

Um einen möglichen Effekt von Nahinfrarotlicht (NIR) auf die Vasoaktivität zu untersuchen, wurde ein Teil des Hirnschnittes, welcher das zu untersuchende Gefäß beinhaltet, mit Wellenlängen von 850 bis 950nm bestrahlt.

Dazu wurde ein Infrarotfilter (Nikon) benutzt, der in den Lichtweg des Mikroskops zwischengeschaltet wurde. Ausgehend von einer Nikon Halogenlampe (100W/12V) traf das gefilterte Licht mit einer Intensität von 7mW/cm^2 auf den Hirnschnitt. Die Intensität wurde im Vorfeld mit Hilfe eines Powermeters (Coherent, Inc.) bestimmt. Nach 10-minütiger Baseline-Periode erfolgte die Bestrahlung für 60 Minuten.

3.7.3 Fluoreszenzversuche DAF-FM-DA

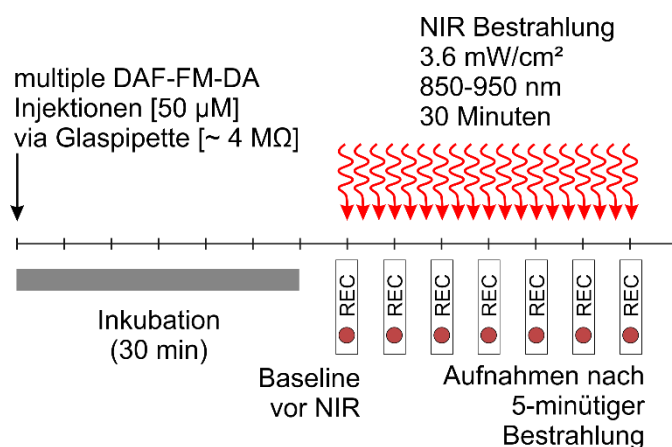


Abb.11: Zeitlicher Ablauf der Fluoreszenzversuche mit DAF-FM-DA. Nach 30-minütiger Inkubationsperiode wurde der Hirnschnitt für 30 Minuten mit NIR (850-950nm; $3,6\text{mW/cm}^2$) bestrahlt. Nach aufgenommener Baseline fanden weitere Aufnahmen nach je 5min während der NIR-Bestrahlung statt.

Der Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM-DA wurde in einer Konzentration von 50µM mit einer 4 MΩ-Glaspipette um die fokussierte Arteriole in Hirnschnitten von C57BL/6J-Mäusen injiziert. Dazu wurde ein Picospritzer® II der Firma Parker Instrumentation mit einem angelegten Druck von 4psi benutzt. Die Injektionstiefe in den Hirnschnitt betrug durchschnittlich 65µm über eine Distanz von 120µm. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten fand eine Exzitation des Farbstoffs bei 488nm statt. Die Fluoreszenzemission wurde bei 515nm mit einer CCD-Kamera detektiert. Eine Aufnahmesequenz umfasste 10 Bilder bei einer Expositionszeit von 4000ms. Nach aufgenommener Baseline-Periode wurde der Hirnschnitt in 5-minütigen Intervallen mit Nahinfrarotlicht (850-950nm) mit einer Intensität von 3,6mW/cm² bestrahlt. Nach jedem Intervall wurde eine weitere Fluoreszenzsequenz aufgenommen, bis zu einer Gesamtdauer von 30 Minuten NIR-Bestrahlung.

Des Weiteren wurden Versuche durchgeführt, bei der die Autofluoreszenz des Hirngewebes gemessen wurde. Die Experimente folgten demselben Bestrahlungsmuster, allerdings ohne eine vorangegangene Färbung des Hirnschnitts. Diese Experimente dienten als Kontrollgruppe für die Fluoreszenzversuche.

Während der gesamten Zeit befanden sich die Hirnschnitte in einem zirkulierendem aCSF-Bad, welches mit Carbogen begast und auf 35°C erwärmt wurde.

3.8 Auswertung

3.8.1 Gefäßdurchmesser Messung

Zur Messung des Gefäßdurchmessers wurden penetrierende Arteriolen im visuellen Kortex auf Höhe der Lamina II/III aufgesucht, da in diesem Bereich eine ausreichende Dicke der glatten Muskulatur der Gefäßwand zu erwarten ist. Der visuelle Kortex bot sich für die Untersuchung an, da er bereits bei jungen Tieren vergleichsweise weit entwickelt ist und deshalb eine adäquate Gefäßversorgung aufweist. Die Entscheidung, ob sich ein Gefäß als passend erwies, wurde einerseits aufgrund des Durchmessers - welcher sich zwischen 15 und 40µm bewegen sollte - und andererseits aufgrund der Wanddicke (mind. 2,5µm) getroffen, um eine Abgrenzung zu venösen Gefäßen sicherzustellen.

Über den gesamten Messzeitraum von 70 bzw. 145 Minuten wurde alle 5 Minuten eine Aufnahme des Gefäßes gemacht, wobei die Halogenlampe des Mikroskops nur zur Bildakquisition angeschaltet wurde, um sowohl die lichtsensiblen Substanzen, als auch den Hirnschnitt vor zu hohen Lichtintensitäten zu schützen. Zur Auswertung diente die Open-Source-Software ImageJ (National Institutes of Health, Washington, USA). In jedem Einzelbild wurde der Innendurchmesser durch eine Flächenkalkulation über eine Länge von 50µm gemessen. Dies diente dazu, eine Mittelung des Durchmessers über einen größeren Abschnitt der Arteriole zu erhalten, da dieser an einzelnen Stellen durch Unregelmäßigkeiten der glatten Muskulatur stärkeren Schwankungen unterliegt (Abb.12).

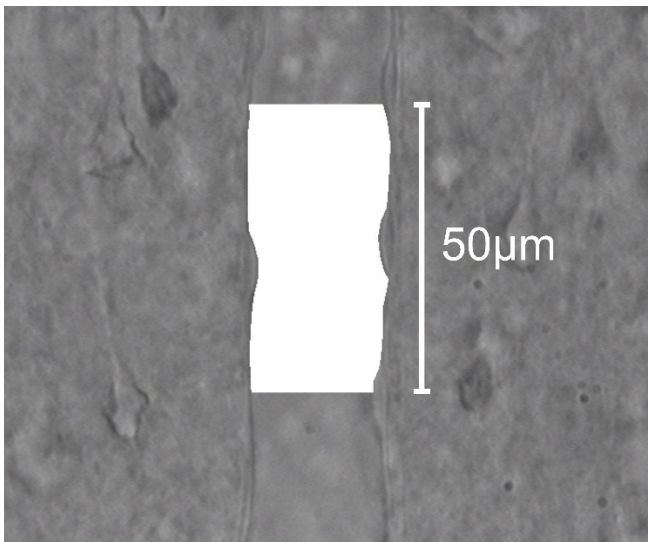


Abb.12: Beispielhafte Darstellung der Flächenkalkulation zur Mittelung des Durchmessers über eine Gefäßstrecke von 50µm

Aus diesen Rohdaten wurde der Durchmesser prozentual, bezogen auf das jeweilige Basisniveau des Versuchs, normiert. Das Ausgangsniveau ergab sich als Mittelwert der letzten drei Messpunkte (10 Minuten-Intervall) vor der Applikation der Substanz. Die Kontraktion, die das Gefäß am Ende des Experiments zeigte, berechnete sich analog dazu als Mittelwert der letzten drei gemessenen Durchmesserwerte.

3.8.2 Auswertung Fluoreszenz

Mittels der Software ImageJ wurden in den aufgenommenen Bildsequenzen spezifisch glatte Muskelzellen der Gefäßwand bzw. Pyramidenzellen markiert. In dieser ROI (*region of interest*) wurde über die Zeit der mittlere Grauwert, der die Fluoreszenzintensität repräsentiert, ermittelt. Referenzwert war die Grauwertintensität vor Beginn der NIR-Illumination des Hirnschnitts. Alle nachfolgend

gemessenen Werte wurden auf den Referenzwert des jeweiligen Versuchs prozentual in Relation gesetzt und als relative Änderung der Fluoreszenz über die Zeit dargestellt.

3.9 Infrarotbestrahlung der HDPs (Aufbau)

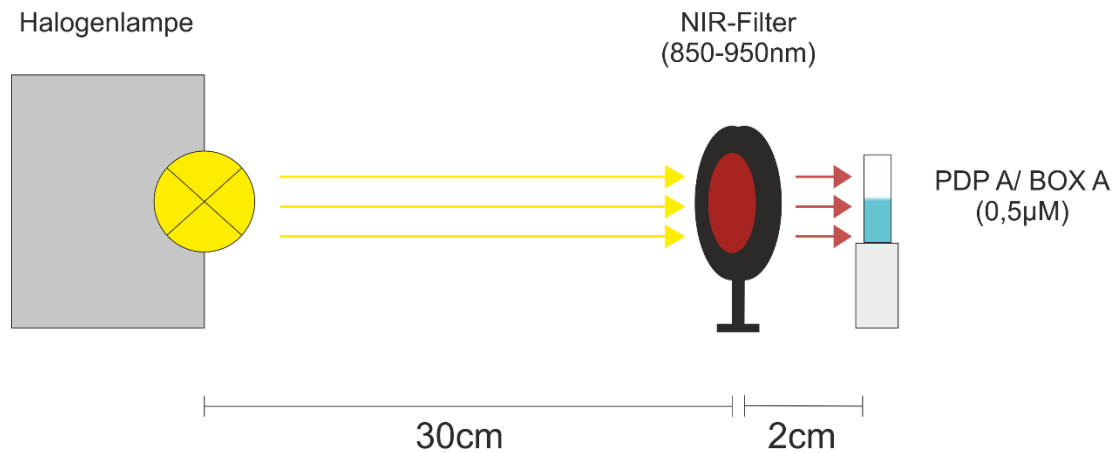


Abb.13: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus; Bestrahlung einer Probe PDP A/BOX A mit Infrarotlicht über 3h durch einen NIR- Filter, der nur Wellenlängen von 850-950nm passieren lässt. Die Intensität an der Küvette betrug 9,0 mW/cm²

Um die Stabilität von PDPs und BOXes im Nahinfrarotbereich zu testen, wurde eine Probe mit Wellenlängen von 850-950nm bestrahlt. Die PDPs/BOXes wurden dafür in 1ml aCSF gelöst, um eine Konzentration von 0,5µM zu erhalten. Die Lösung wurde in eine Glasküvette gefüllt und mit einer Halogenlampe mit nachgeschaltetem NIR-Filter über insgesamt 3h bestrahlt (Abb. 13). Die Strahlungsintensität an der Küvette betrug 9,0mW/cm². Im Abstand von 60 Minuten wurde je eine 100µl Probe entnommen, in ein lichtgeschütztes Safe-lock-Gefäß (Eppendorf) pipettiert und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Die Analyse der Proben fand in den Laboren des IAAC statt.

Für die Zeit der Bestrahlung wurde der Laborraum abgedunkelt, sodass eine Verfälschung der Ergebnisse durch Streulicht anderer Lichtquellen ausgeschlossen wurde.

3.10 Nachanalyse der HDP Proben

Um nach dem Experiment sicher zu gehen, dass die HDPs über den Messzeitraum stabil waren, nicht isomerisierten oder durch Lichteinfall zerfielen, wurden die genommenen Proben durch Marcel Ritter (IAAC) nachanalysiert.

Die gefrorenen Proben wurden auf Trockeneis transportiert.

Zur Vorbereitung der jeweiligen Probe wurde diese zunächst aufgetaut und zentrifugiert (5min, 16000 xg). 100µl dieser Lösung wurden daraufhin in eine Küvette mit Einsatz gefüllt. Durch UHPLC-MS (*ultra high performance liquid chromatography – mass spectrometry*) (Dionex UltiMate 3000 UHPLC und Q-Exactive Plus Orbitrap Massenspektrometer, Thermo Fisher Scientific) mit einer Kinetex C18-Säule (1,7µm, 50x2,1mm, Phenomenex) ist es möglich, die in der Lösung befindlichen Isomere durch verschiedene Elutionszeiten zu unterscheiden. Die dabei herausgekommenen Peak-Flächen der Isomere können miteinander verglichen und ins Verhältnis gesetzt werden (Abb. 14). Somit ist eine Aussage möglich, wie sich das gewünschte Isomer zum ungewünschten verhält (z.B. PDP A1 vs. A2). So kann ein zeitlicher Verlauf des Isomerisierungsverhältnisses über den Experimentierzeitraum erstellt werden.

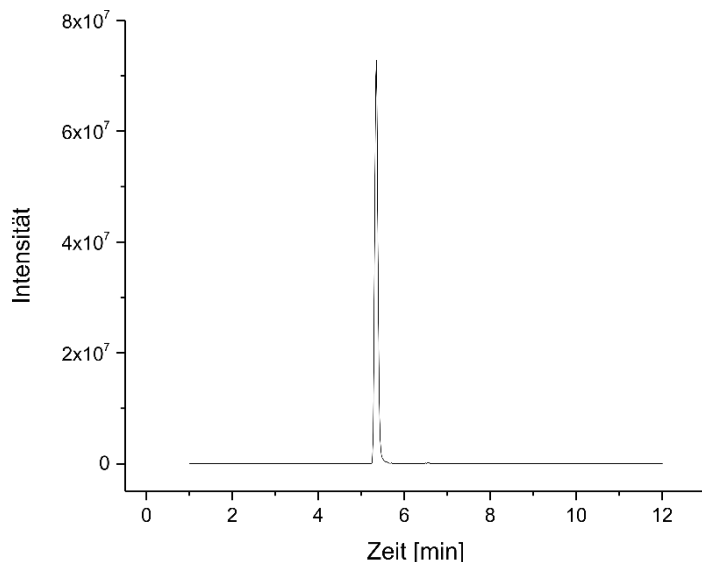


Abb.14: Beispielkurve eines UHPLC-MS für PDP A1; Elutionszeit für PDP A1 bei 5,3 min und für PDP A2 bei 6,6 min; (gezeigt ist ausschließlich die Massenspur der exakten Masse der PDPs (A1). Die Fläche unter dem Peak steht in direktem Zusammenhang mit der Stoffkonzentration, sodass

Die genommenen Proben der NIR-Bestrahlungsexperimente wurden ebenfalls nach dem oben genannten Verfahren analysiert.

3.11 Statistik

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mit Origin Pro 9 (Origin Lab, Northhampton, USA) durchgeführt.

Zum Test der statistischen Signifikanz arteriolärer Kontraktion wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Bonferroni-Test als Post-hoc-Verfahren gewählt.

Die dabei angenommene Nullhypothese H_0 lautete: „Die Änderung des arteriolären Durchmessers ist in allen verglichenen Versuchsgruppen identisch.“

Verglichen wurde jeweils der Mittelwert der letzten drei Messpunkte bei HDP-Einwaschung mit denen der Kontrollexperimente, in denen nur L-NAME eingewaschen wurde. Außerdem wurden die Experimentalgruppen untereinander verglichen, um mögliche Unterschiede im vasoaktiven Potential ermitteln zu können.

Für den Vergleich der mit Infrarotlicht bestrahlten HDP-Proben wurde der t-Test für verbundene Stichproben gewählt und in Bezug auf die Nullhypothese „Die gemessenen Konzentrationen der HDPs sind in allen Proben gleich“ geprüft.

Ein statistischer Vergleich der Fluoreszenzexperimente wurde zwischen der DAF-FM-DA gefärbten und der Autofluoreszenzgruppe durchgeführt. Verwendet wurde ein Zwei-Stichproben-t-Test unter Annahme folgender Nullhypothese: „Die gemessenen Fluoreszenzen in den Versuchsgruppen nach NIR-Bestrahlung sind in allen Experimenten gleich.“

Zur Ablehnung der Nullhypothesen wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ festgelegt. In Abhängigkeit des p-Wertes können folgende Signifikanzstufen angenommen werden:

*	$p < 0,05$	signifikant
**	$p < 0,01$	hoch signifikant
***	$p < 0,001$	höchst signifikant

Es wird von einer Normalverteilung der gemessenen Daten ausgegangen. Die in den Diagrammen dargestellten Mittelwerte (MW) werden jeweils mit der Standardabweichung ($\pm SD$) abgebildet. Eine Ausnahme bilden die Fluoreszenzexperimente, bei denen der Mittelwert mit dem Standardfehler (*standard error of the mean*; SEM) angegeben wird.

Die angegebenen n-Werte beziehen sich auf die Anzahl der genutzten Hirnschnitte. Da ein Hirnschnitt pro Maus verwendet wurde, ist dieser Wert äquivalent mit der Anzahl der verwendeten Versuchstiere. Bei den Fluoreszenzversuchen bezieht sich der angegebene n-Wert auf die Anzahl der vermessenen Zellen.

4. Ergebnisse

4.1 Stabilität unter aCSF

Zu Beginn der Arbeit war es wichtig zu überprüfen, ob der Versuchsaufbau eine Aussage über die Änderung des Gefäßdurchmessers bei Substanzapplikation zulässt.

Dazu sollte sich über den Messzeitraum ein möglichst stabiler Ruhetonus des Gefäßes einstellen, sodass mögliche Überlagerungen in darauffolgenden Versuchsgruppen weitestgehend ausgeschlossen werden können.

Über einen gesamten Zeitraum von 70 Minuten wurde deshalb der arterioläre Durchmesser unter reiner aCSF-Perfusion an C57BL/6J-Mäusen gemessen.

Der arterioläre Durchmesser zeigte im Mittel keine nennenswerten Schwankungen (Abb.15) und auch nach 70 Minuten keine signifikante Änderung in Bezug auf das Ausgangsniveau ($100 \pm 2\%$; $p=0,61$; t-Test [1 Stichprobe]; $n=5$).

Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass sich das *in vitro*-Modell dazu eignet, die Vasoaktivität verschiedener Substanzen zu testen, da der Gefäßdurchmesser ohne pharmakologische Beeinflussung stabil bleibt.

4.2 Vorspannung durch L-NAME

4.2.1 L-NAME über 70 Minuten

Der fehlende Blutdruck im Schnittmodell bringt den Nachteil mit sich, dass die natürliche Vorspannung der Gefäßwand fehlt. Der NO-Synthase-Inhibitor L-NAME führt durch Senkung des Stickstoffmonoxidspiegels zu einer erhöhten Kontraktilität der Arteriolen und somit zu einer Verringerung des Durchmessers. Da in der Arbeitshypothese davon ausgegangen wird, dass die HDPs ebenfalls eine Kontraktion hervorrufen, wurde im Vorfeld der vasogene Effekt des Pharmakons separat untersucht, um seine Eignung für das Experiment zu ermitteln und die Amplitude und zeitliche Veränderung des Durchmessers zu quantifizieren.

Außerdem konnte auf diese Weise der günstigste Zeitpunkt für die Zugabe der HDPs ermittelt werden. Dieser sollte idealerweise so liegen, dass der Durchmesser unter L-NAME-Perfusion relativ stabil geworden ist.

Bei einer angesetzten Konzentration von 100 μ M führte L-NAME nach 10-minütiger Baseline innerhalb von 60min zu einer Verminderung des Durchmessers auf $89 \pm 3\%$. Die Kontraktion unterscheidet sich signifikant von den reinen aCSF-Versuchen ($p < 0,001$, ANOVA [einfaktoriell], $n=5$).

Außerdem kann am Verlauf der Kurve über die Zeit (Abb.15) gezeigt werden, dass die Kurve nach 40-minütiger Applikationszeit ein Plateau zeigt, in dem der Gefäßdurchmesser keinen größeren Schwankungen mehr unterliegt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde festgelegt, dass die Zugabe der PDPs oder BOXes nach 45-minütiger Phase der Vorspannung durch L-NAME stattfindet.

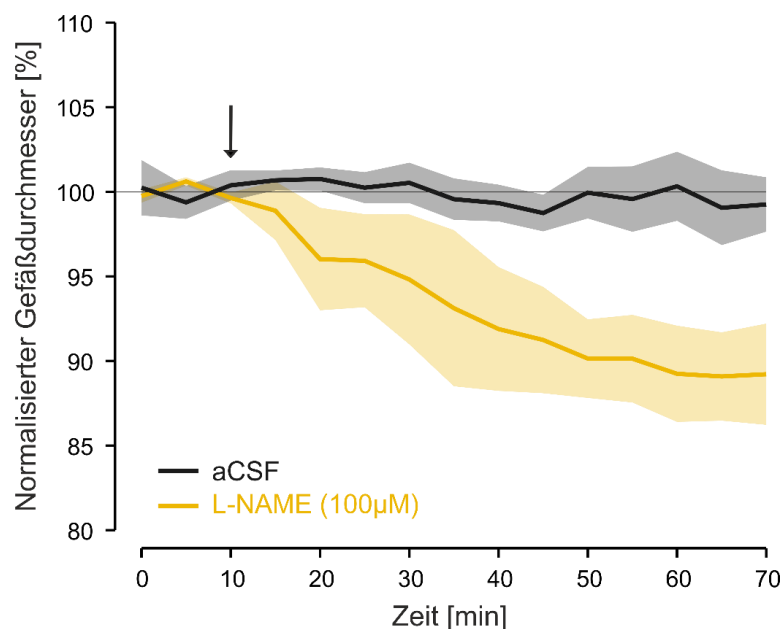


Abb.15: Darstellung des normalisierten Gefäßdurchmessers im Zeitverlauf über insgesamt 70 Minuten. Zu sehen ist die Wirkung reiner aCSF-Perfusion ($n=5$; C57BL/6J; MW \pm SD) und der Effekt des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME ($n=5$; C57BL/6J; MW \pm SD), welcher nach einer 10-minütigen Baseline-Periode appliziert wurde. Der Zeitpunkt der Einwaschung der L-NAME-Lösung ist mit einem Pfeil im Diagramm markiert.

4.2.2 L-NAME über 145 Minuten an WT und KO

Neben der Abschätzung der Dauer bis zum Erreichen einer stabilen Baseline nach L-NAME-Perfusion wird diese experimentelle Serie auf Slo1-Wildtyp- und Slo1-Knockout-Mäuse übertragen und von 70 auf 145 min ausgedehnt. Ziel ist es,

Kontrollexperimente durchzuführen, welche den gesamten Messzeitraum unten aufgeführter HDP-Messreihen abdecken und durch die Verwendung gleicher Mauslinien eine statistische Vergleichbarkeit ermöglichen.

Aus den 70-minütigen Pilotmessungen in C57BL/6J-Mäusen geht nicht hervor, ob das nach 35-50 Minuten Einwaschzeit erreichte Plateau unter der fortgesetzten L-NAME-Applikation stabil bleibt oder weitere Änderungen der Gefäßweite zu erwarten sind.

Ausgehend von der Baseline nach 45-minütiger Applikation von L-NAME zeigte sich in beiden Genotypen eine weitere Kontraktion der Arteriolen, welche nach einer Plateauphase von ca. 35-45 Minuten auftritt (Abb. 16). Dabei verengt sich der Durchmesser für die Wildtypen um durchschnittlich weitere 5% auf $95\pm5\%$ ($n=8$) und für die Knockout-Tiere auf $92\pm3\%$ ($n=5$). Auch wenn der Effekt des L-NAME auf KO-Mäuse etwas stärker ausfällt gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,46$).

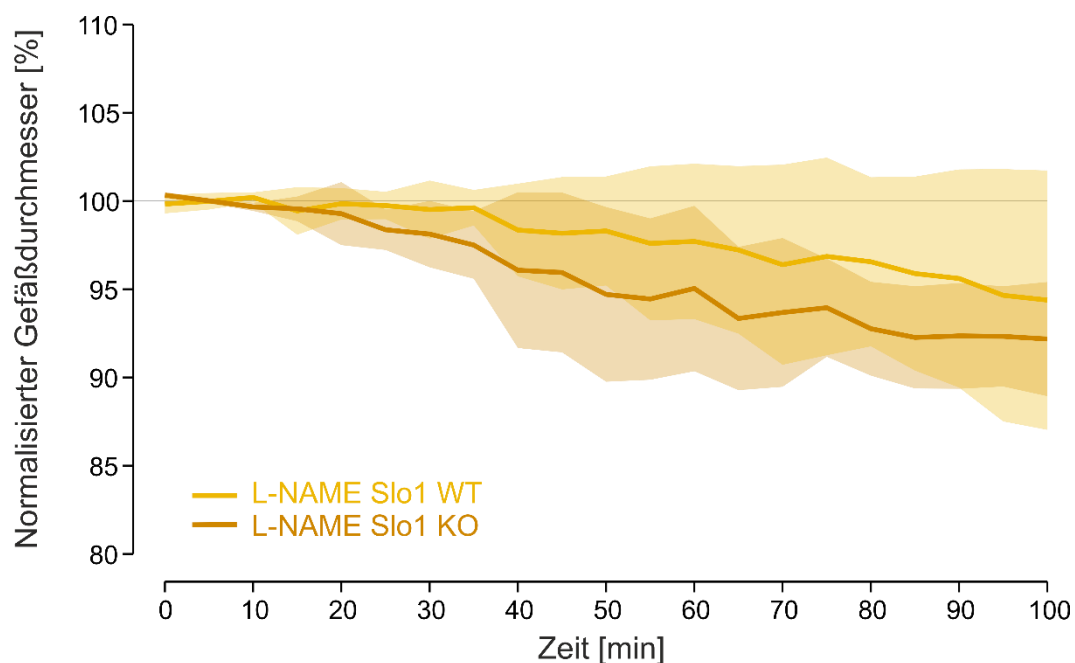


Abb.16: Vergleich der zeitlichen Veränderung des Gefäßdurchmessers ($MW \pm SD$) nach L-NAME-Perfusion ($100 \mu M$) in Slo1-Wildtyp- ($n=8$) und Knockout-Mäusen ($n=5$) über 90 Minuten mit 10-minütiger Baseline. Die Messung startete nachdem bereits eine 45-minütige Vorspannung durch L-NAME stattgefunden hatte.

4.3 Konzentrationsuntersuchungen zu BOX A & PDP A

Um eine Einschätzung vornehmen zu können, in welchen Konzentrationen die HDPs eine arterioläre Kontraktion hervorrufen, wurden drei Konzentrationsstufen an Slo1 WT-Mäusen getestet und somit eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erstellt. Somit ist ein Vergleich zu im Liquor von SAB-Patienten gemessenen Konzentrationen möglich und das Potential zur Vasospasmusentwicklung kann besser eingeschätzt werden.

4.3.1 Z-PDP A1/2 syn

Ein Gemisch aus Z-PDP A1 und A2 wurde in Konzentrationen von $0,5$ bzw. $0,05 \mu M$ getestet.

Dabei konnten die Substanzen in der kleinsten Konzentration von $0,05 \mu M$ keine signifikante Kontraktion im Hirnschnittmodell hervorrufen. Der arterioläre Durchmesser verringerte sich nach 90 Minuten auf $95 \pm 4\%$ ($n=6$) ausgehend vom Ausgangsniveau und unterschied sich dabei nicht von den L-NAME-Kontrollversuchen ($p=0,93$).

Bei der zehnfachen Konzentration von $0,5 \mu M$ konnte dagegen eine signifikante Kontraktion gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden ($p=0,0039$). Die Gefäße zeigten durchschnittlich eine Kontraktion auf $85 \pm 5\%$ ($n=6$) verglichen mit dem Ausgangswert.

Des Weiteren ist der Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen $0,5 \mu M$ und $0,05 \mu M$ hoch signifikant ($p=0,003$). Dem gegenüber gibt es keinen Unterschied bei dem Vergleich zwischen Z-PDP A1/2 $0,5 \mu M$ und $5 \mu M$ ($p=0,34$) [Experimente Z-PDP deg $5 \mu M$ durchgeführt von Dr. med. Alexander Jörk und Milena Günther, B.Sc., Juni 2016].

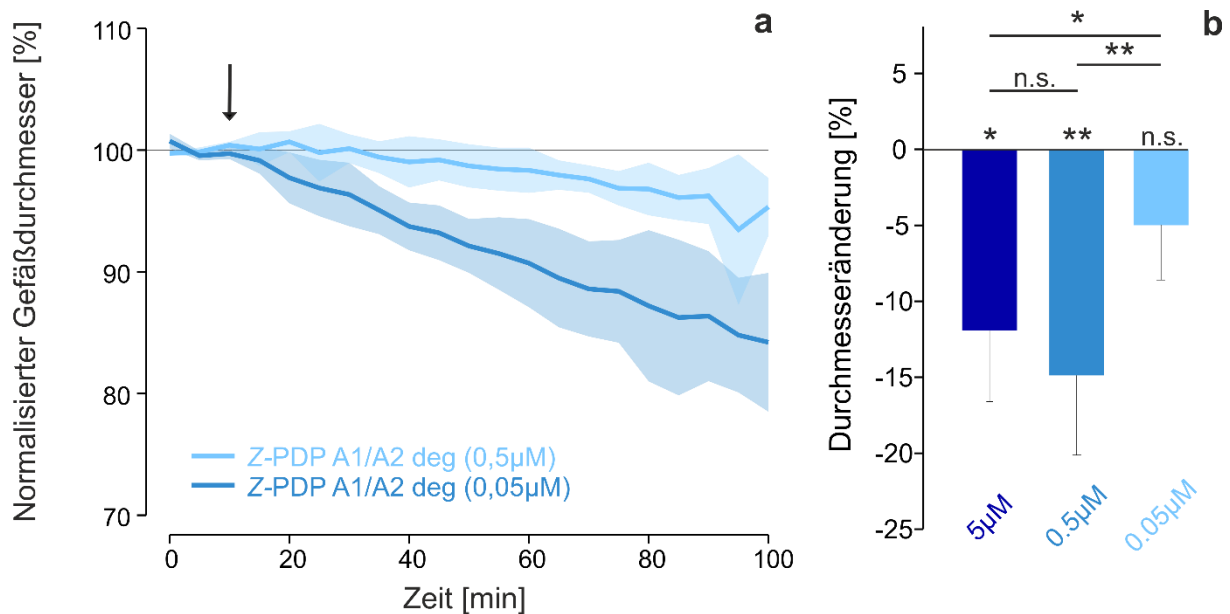


Abb.17: (a) Zeitliche Veränderung des arteriolen Durchmessers (MW±SD) nach Zugabe von Z-PDP A1/2 deg (0,5µM/0,05µM; je n=6) in Slo1-Wildtyp-Mäusen über 90 Minuten. Der Beginn der Perfusion ist mit einem Pfeil markiert und startete nach 45-minütiger L-NAME-Präinkubation. **(b)** MW±SD der Durchmesseränderung zum Ende der Experimentalzeit (80.-90. Minute) für Z-PDP A1/2 deg in 5µM/0,5µM/0,05µM mit statistischem Vergleich untereinander und zur Kontrollgruppe.

4.3.2 Z-BOX A syn

Analog zu den zuvor beschriebenen Experimenten wurde eine Konzentrationsreihe mit Z-BOX A syn in den Konzentrationen 0,5 und 0,05µM an Slo1-WT-Mäusen durchgeführt. Verglichen wurden die Ergebnisse mit den schon vorliegenden Studien, in denen eine Konzentration von 5µM verwendet wurde.

Nach 90-minütiger Perfusionszeit konnte durch 0,05µM Z-BOX A syn keine signifikante Kontraktion der Arteriole hervorgerufen werden ($p=0,92$). Der Durchmesser verringerte sich auf ein Niveau von $95\pm4\%$ verglichen mit der Baseline.

Die zehnfach höhere Konzentration von 0,5µM konnte in Absolutwerten eine leicht stärkere Kontraktion in der Arteriole auslösen ($93\pm4\%$), allerdings zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied zu den L-NAME-Kontrollstudien ($p=0,36$).

Eine nennenswerte Verminderung des Durchmessers auf $87\pm2\%$ konnte erst bei einer Konzentration von 5µM beobachtet werden (Experimente durchgeführt von Dr. med. Alexander Jörk, August 2017). Dieser Effekt unterscheidet sich sowohl von der

Kontrollgruppe statistisch signifikant ($p=0,004$), als auch von beiden anderen getesteten Konzentrationen.

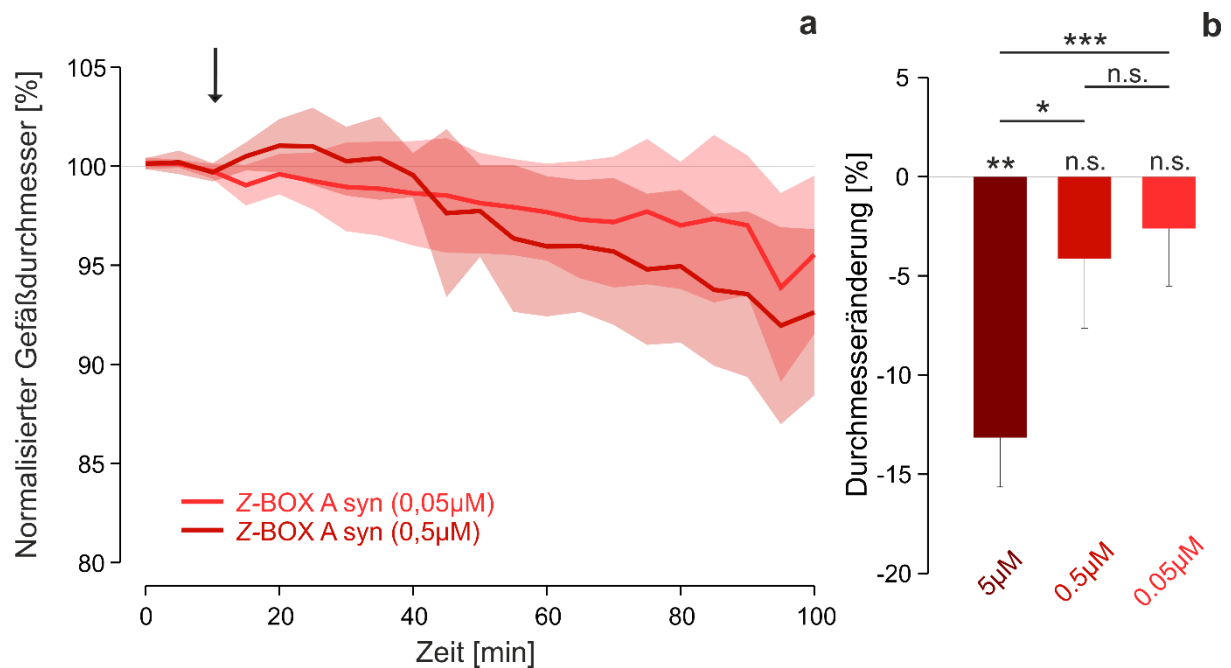


Abb.18: (a) Zeitliche Veränderung des arteriölen Durchmessers (MW±SD) nach Zugabe von Z-BOX A syn (0,5µM/0,05µM; je n=6) in Slo1-Wildtyp-Mäusen über 90 Minuten. Der Beginn der Perfusion ist im Diagramm mit einem Pfeil markiert und startete nach 45-minütiger L-NAME-Präinkubation. **(b)** MW±SD der Durchmesseränderung zum Ende der Experimentalzeit (80.-90. Minute) für Z-BOX A syn in 5µM/0,5µM/0,05µM mit statistischem Vergleich untereinander und zur Kontrollgruppe.

4.4 Einzelisomere der PDPs

Um eine Abschätzung tätigen zu können, ob es Unterschiede im konstriktiven Potential zwischen den degradierten Einzelisomeren der PDP-Substanzfamilie gibt, wurden diese in einzeln in Slo1- Wildtyp-Mäusen getestet.

In der A-Gruppe (Abb.19) zeigte das PDP A1-Isomer nach 90 Minuten eine Abnahme des Gefäßdurchmessers auf $83\pm4\%$ (5µM; n=4). Das A2-Isomer verengte die Arteriole auf $77\pm1\%$ (5µM; n=4) verglichen mit dem Baseline-Niveau.

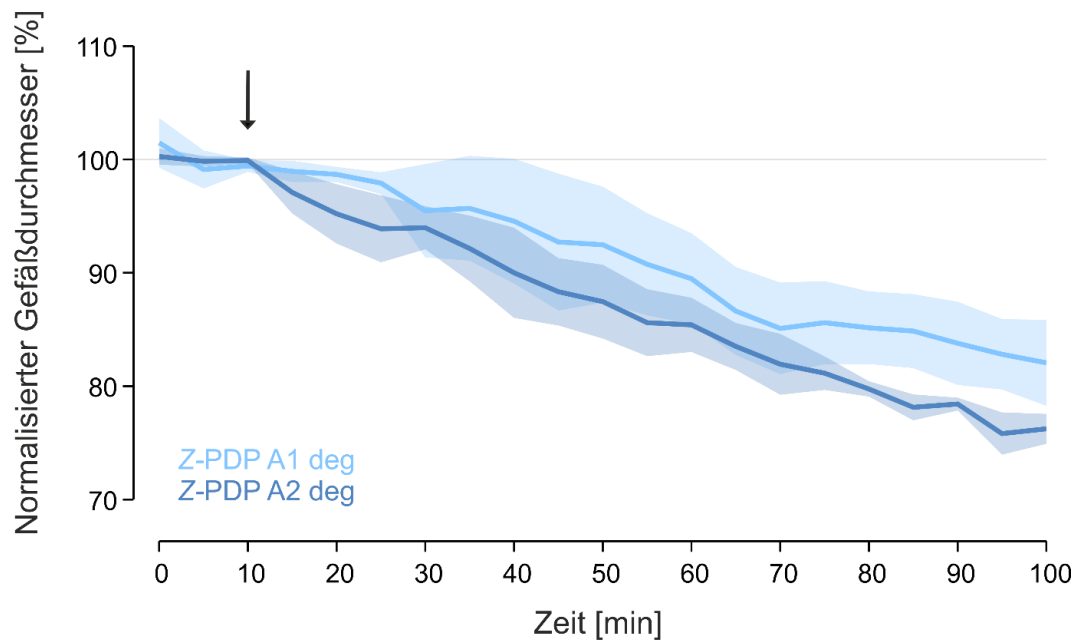


Abb.19: Zeitliche Veränderung des arteriulären Durchmessers in Hirnschnitten von Slo1-WT-Mäusen (MW±SD) nach Zugabe von Z-PDP A1 deg (5µM; n=4) oder Z-PDP A2 deg (5µM; n=4) in die Perfusionslösung. Der Beginn der Applikation ist im Diagramm mit einem Pfeil markiert.

In der PDP B-Gruppe (Abb.20) verengte das B1-Isomer den Durchmesser auf $89\pm6\%$ (5µM; n=5). Das B2-Isomer zeigte eine Reduktion auf $81\pm7\%$ (5µM; n=5). Insgesamt sind die Versuche in dieser Gruppe durch eine höhere Streuung gekennzeichnet, verglichen mit den beiden A-Isomeren.

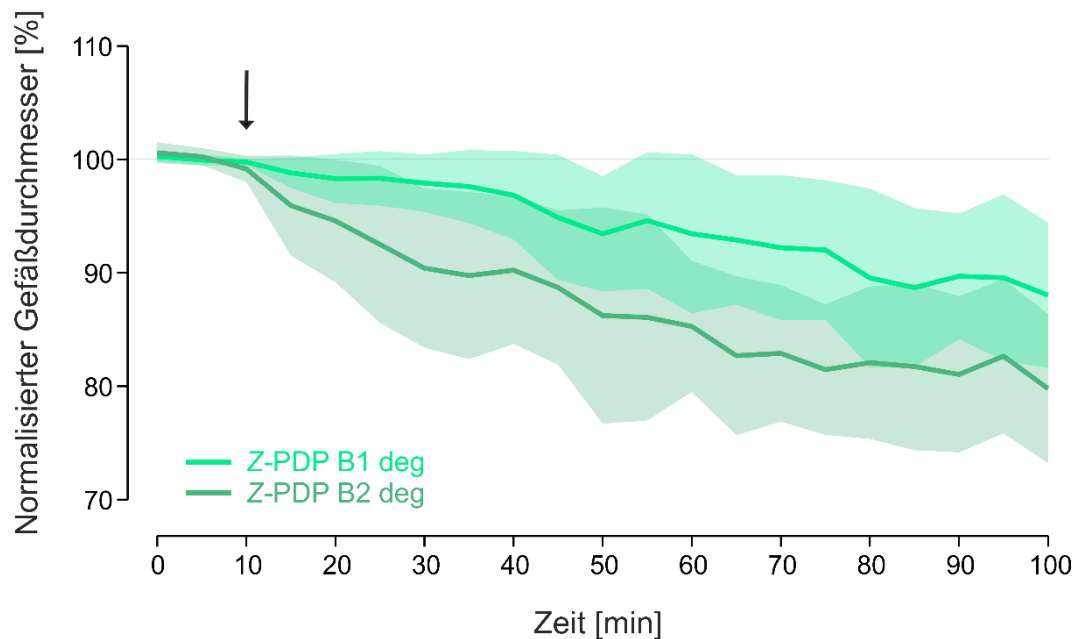


Abb.20: Zeitliche Veränderung des arteriolen Durchmessers in Hirnschnitten von Slo1-WT-Mäusen (MW±SD) nach Zugabe von Z-PDP B1 deg (5µM; n=4) oder Z-PDP B2 deg (5µM; n=5) in die Perfusionslösung. Der Beginn der Applikation ist im Diagramm mit einem Pfeil markiert.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten die Isomere A1 ($p=0,0018$), A2 ($p<0,001$) und B2 ($p=0,0014$) eine signifikante Gefäßverengung hervorrufen. Die schwächere Kontraktion, die durch Z-PDP B1 auftrat, unterschied sich statistisch nicht von den Kontrollversuchen ($p=0,106$).

Beim Vergleichen der Isomere untereinander (Abb.21) fällt auf, dass das A2 bzw. B2 Isomer für beide Gruppen eine stärkere Wirkung entfaltet, als das jeweilige A1/B1 Isomer. Dabei zeigte PDP A2 eine signifikant stärkere Reduktion des arteriolen Durchmessers als PDP A1 ($p=0,013$). Der beobachtete Unterschied zwischen dem B1- und B2-Isomer stellte sich allerdings als nicht signifikant heraus ($p=0,112$).

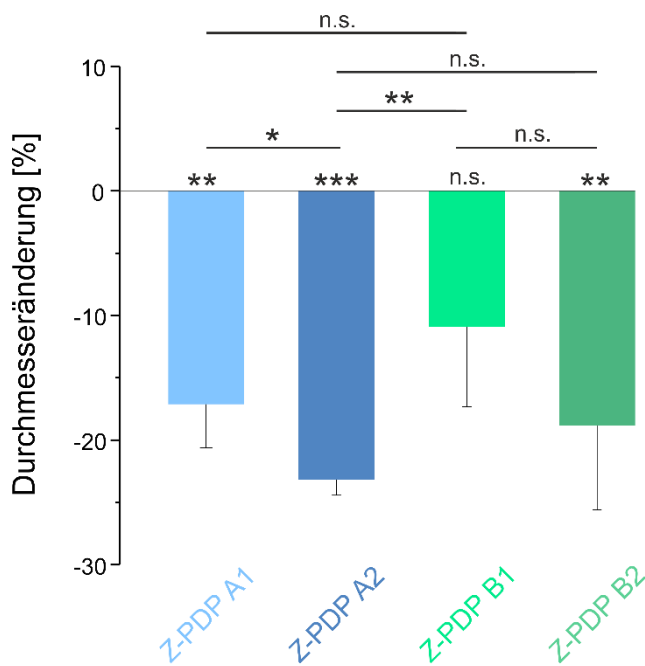


Abb.21: Vergleich des konstriktiven Potentials der Z-PDP-Einzelisomere A1/A2/B1/B2 nach 90-minütiger Perfusion (MW±SD) in Hirnschnitten von Slo1-Wildtyp-Mäusen. Die Signifikanzangaben direkt an den Säulen beziehen sich auf die L-NAME Kontrollgruppe der Slo1-WT-Mäuse.

Die Nachanalyse der während des Experiments abgenommenen Proben durch Marcel Ritter (IAAC) ergab eine Stabilität der Einzelisomere über den Versuchszeitraum. Es fand keine nennenswerte Umlagerung zu einem der anderen Isomere statt. Die in Tabelle 7 aufgeführten Faktoren werden als ausreichend bewertet, um die ermittelten Effekte der Durchmesseränderung auf die Einzelisomere zurückführen zu können.

	<i>[PDP A1] / [PDP A2]</i>	<i>[PDP A2] / [PDP A1]</i>	<i>[PDP B1] / [PDP B2]</i>	<i>[PDP B2] / [PDP B1]</i>
0 min	391±151	43±6	32±3	26±6
90 min	353±138	45±7	33±4	25±5

Tab.7: Tabellarische Ansicht der UHPLC-MS-Ergebnisse der asservierten PDP-Proben. Dargestellt ist, um welchen Faktor das jeweils gewünschte Isomer im Vergleich mit dem nicht gewünschten in der Lösung vorhanden ist (±SD).

4.5 E-BOX A syn

Die durch Bestrahlung entstandenen *E*-Isomere von BOX A syn stellen weitere Isomere der HDPs dar. Diese unterscheiden sich lediglich in der Stellung der Substituenten einer Doppelbindung. Da es sich strukturell nur in dieser Stellung von Z-BOX A syn unterscheidet, bei dem das konstriktive Potential bereits nachgewiesen werden konnte, war es interessant, eventuelle Unterschiede in der Wirkung der beiden Isomere zu untersuchen. Getestet wurde die Substanz wiederum an Slo1-WT-Mäusen in einer Konzentration von 5 μ M über insgesamt 90 Minuten.

Nach diesem Zeitraum verringerte sich der arterioläre Durchmesser auf $94\pm 6\%$ verglichen mit dem Ausgangswert. Dieser unterschied sich nicht von der Kontrollgruppe. Somit wird durch *E*-BOX A syn keine signifikante Kontraktion ausgelöst ($p=0,78$). Des Weiteren ist die Kontraktion, welche vom entsprechenden Z-Isomer ausgelöst wird, deutlich größer ($p=0,01$). Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass durch die Isomerisierung in die *E*-Form das konstriktive Potential von BOX A signifikant schwächer wird.

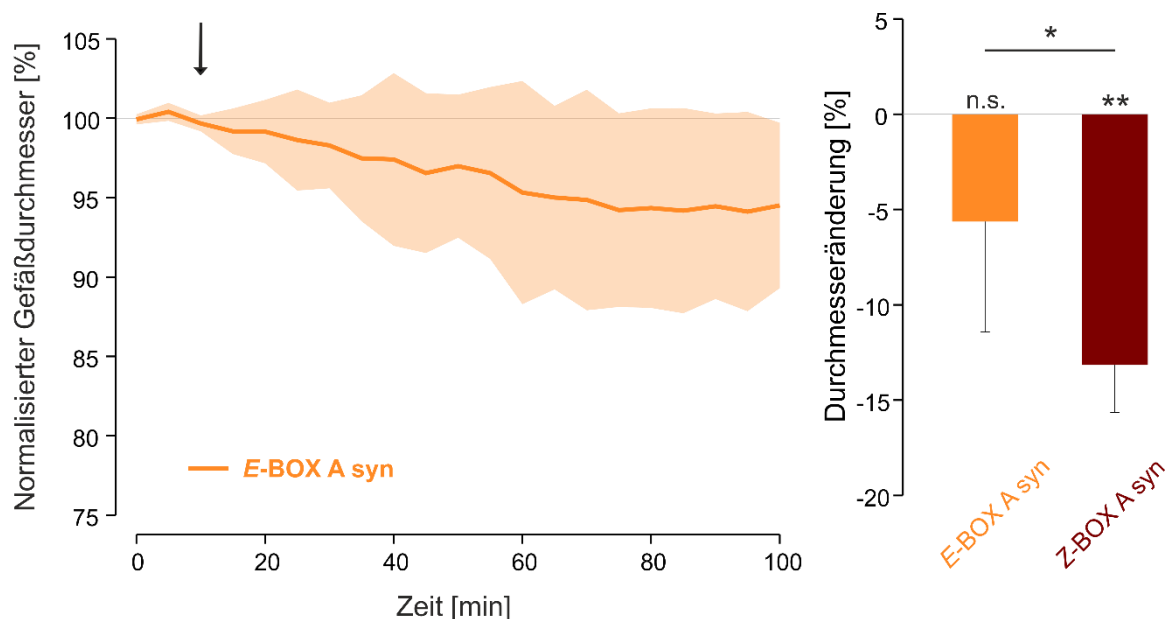


Abb.22: (a) Zeitliche Veränderung des arteriolären Durchmessers (MW \pm SD) nach Applikation von *E*-BOX A syn (5 μ M; je n=6) über 90 Minuten. Der Beginn der Perfusion ist im Diagramm mit einem Pfeil markiert und startete nach 45-minütiger Vorspannung durch 100 μ M L-NAME. (b) Mittelwerte \pm SD der Durchmesseränderung zum Ende der Experimentalzeit (80.-90. Minute) für Z-BOX A syn und *E*-BOX A syn (je 5 μ M) mit statistischem Vergleich untereinander und zur Kontrollgruppe.

Um eine Rückisomerisierung in das Z-Isomer zu untersuchen, wurden auch hier Nachanalysen durch Marcel Ritter (IAAC) durchgeführt. Die Probenanalyse zeigte zu Beginn der Experimente einen Anteil von $0,52 \pm 0,19\%$ und zum Ende einen Anteil von $0,74 \pm 0,19\%$ von Z-BOX A im Vergleich zu E-BOX A. Bei diesen geringen Konzentrationen des Z-Isomers kann eine Einflussnahme auf den Gefäßdurchmesser vernachlässigt werden und der beobachtete Effekt allein E-BOX A zugeschrieben werden.

4.6 BOX C deg

BOX C ist ein neu entdecktes Molekül, welches der Familie der Hämabbauprodukte angehört (Ritter et al. 2018). Sein konstriktives Potential wurde deswegen an Slo1-WT- und KO-Mäusen getestet, um eine Abhängigkeit der Wirkung vom BK-Kanal feststellen zu können.

Bei einer Konzentration von $5\mu\text{M}$ ließ BOX C deg die Arteriolen in Wildtyp-Mäusen auf $87 \pm 4\%$ kontrahieren. Diese Veränderung des Durchmessers unterschied sich signifikant von der L-NAME-Kontrollgruppe ($p=0,007$). Im Vergleich dazu zeigte BOX C in Knockout-Mäusen keine signifikante Kontraktion ($p=0,06$). Der Durchmesser verminderte sich mit $97 \pm 4\%$ deutlich weniger als in den Wildtyp-Mäusen.

Beim Vergleich der beiden Genotypen zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,002$), aus dem sich ableiten lässt, dass BOX C ebenso wie BOX A und B eine Kontraktion hervorruft, die abhängig von der Expression des BK-Kanals zu sein scheint.

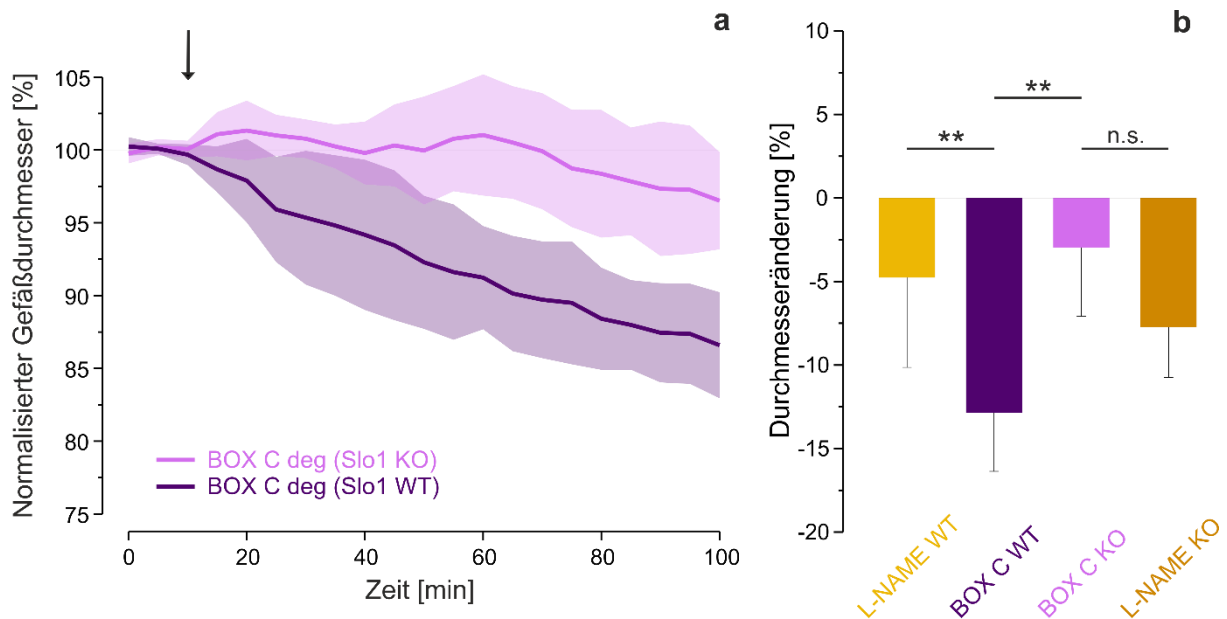


Abb.23: (a) Zeitliche Veränderung des arteriolären Durchmessers (MW±SD) nach Zugabe von BOX C deg (5µM) in Slo1-Wildtyp- (n=6) und -Knockout-Mäusen (n=5) über 90 Minuten. Der Beginn der Perfusion ist im Diagramm mit einem Pfeil markiert und startete nach 45-minütiger L-NAME-Präinkubation. **(b)** Mittelwerte±SD der Durchmesseränderung zum Ende der Experimentalzeit (80.-90. Minute) für BOX C deg in WT- und KO-Mäusen in 5µM mit statistischem Vergleich untereinander und zur Kontrollgruppe (L-NAME). Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. med. Alexander Jörk durchgeführt.

4.7 Infrarot

4.7.1 NIR-Bestrahlung des Hirnschnitts

Als möglicher Therapieansatz des zerebralen Vasospasmus könnte das Nahinfrarotlicht (NIR) positive Einflüsse auf den Durchmesser zerebraler Arteriolen haben und somit den kontraktile Effekten der HDPs entgegenwirken.

Die Bestrahlung eines Hirnschnitts (C57BL/6J) mit Nahinfrarotlicht einer Wellenlänge von 850-950nm und einer Intensität von 7mW/cm² führte im *in vitro*-Modell zu einer Dilatation der eingestellten Arteriole (Abb. 24). Der dabei beobachtete Effekt trat unmittelbar nach Beginn der Bestrahlung auf, sodass bereits zum ersten Messzeitpunkt nach 5 Minuten eine Vergrößerung des Durchmessers zu erkennen war. Nach einer Bestrahlungszeit von 60 Minuten zeigte das Gefäß eine Dilatation

um $10 \pm 7\%$ ($n=7$), wobei die Änderung des Durchmessers zu Beginn am schnellsten war und sich mit fortschreitender Versuchszeit etwas verlangsamte. Trotzdem ist auch am Ende immer noch ein Anstieg zu erkennen.

Trotz relativ großer Schwankungen zwischen den Experimenten ist die beobachtete Dilatation statistisch signifikant im Vergleich zur reinen aCSF-Perfusion ($p=0,006$).

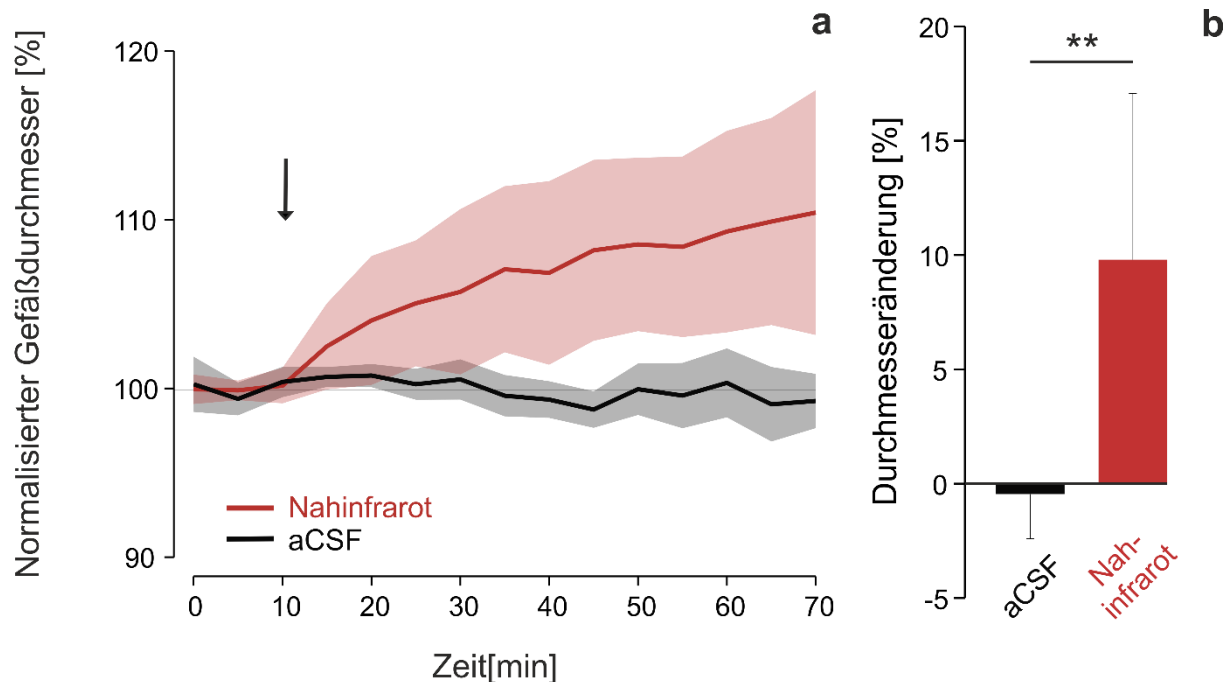


Abb.24: Effekt von Nahinfrarotlicht (NIR) (850-950nm; $7\text{mW}/\text{cm}^2$) auf den arteriolen Durchmesser. **(a)** Zeitliche Änderung des Gefäßdurchmessers nach 60-minütiger NIR-Bestrahlung im Vergleich mit reiner aCSF-Perfusion. Der Beginn ist mit einem Pfeil markiert. **(b)** Statistischer Vergleich des vasoaktiven Potentials nach 60 Minuten NIR-Bestrahlung mit reiner aCSF-Perfusion.

4.7.2 NIR-Bestrahlung der HDP Proben

Nachdem NIR-Licht einen Effekt zeigte, der der HDP-Wirkung entgegengesetzt ist, wurde in einem nächsten Schritt getestet, ob BOXes und PDPs – neben der bekannten Photolabilität im UV-Bereich – auch im nahinfraroten Wellenbereich photoinstabil sind.

Nach 3-stündiger Bestrahlung einer $0,5\mu\text{M}$ Z-BOX A- bzw. Z-PDP A1/2-Lösung zeigte sich kein signifikanter Abfall der Konzentration für beide Substanzen. Durchschnittlich waren nach der Bestrahlung noch $97,1 \pm 6,8\%$ ($n=5$; $\text{MW} \pm \text{SD}$) der zu

Beginn gelösten Z-BOX A-Konzentration in der Probe vorhanden (Abb. 25). Für Z-PDP A1/2 zeigte sich sogar ein leichter Anstieg auf $104,3 \pm 2,2\%$ ($n=5$; $MW \pm SD$) im Vergleich zum Beginn (Abb. 25). Die Konzentrationen wurden gemessen durch Marcel Ritter (IAAC).

Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass die getesteten Stoffe im Bereich des nahinfraroten Lichtes photostabil sind.

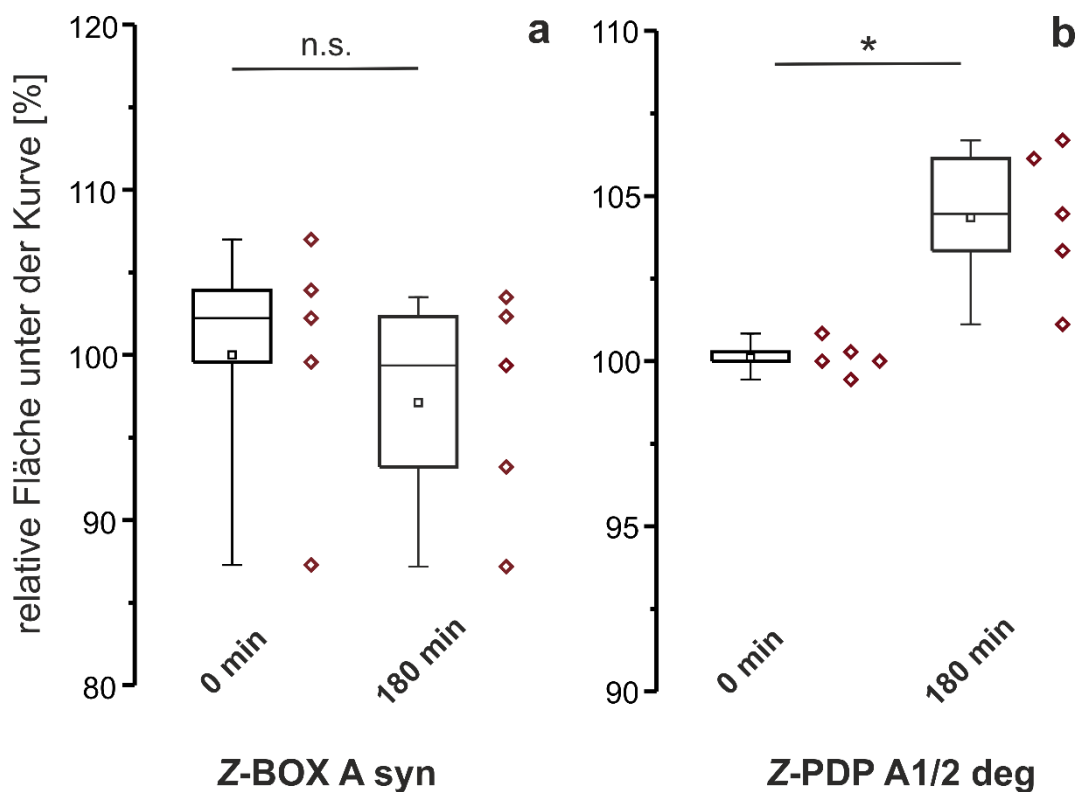


Abb.25: Ergebnisse der Stabilitätsmessungen unter NIR-Bestrahlung (850-950nm; 9mW/cm^2) für **(a)** Z-BOX A syn ($n=5$; $0,5\mu\text{M}$) und **(b)** Z-PDP A1/2 deg ($n=5$; $0,5\mu\text{M}$) zu Beginn und nach 180 min. Dargestellt ist die relative Peakfläche der UHPLC-MS-Kurven.

4.7.3 NO-Freisetzung (DAF-FM-DA)

Um abschließend eine Aussage treffen zu können, ob die beobachtete Dilatation durch eine Freisetzung des Stickstoffmonoxids verursacht wurde, wurde diese mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs DAF-FM-DA in Hirnschnitten von C57BL/6J-Mäusen gemessen. Im zeitlichen Verlauf konnte bereits nach den ersten fünf Minuten

ein Anstieg der Fluoreszenz um $1,2 \pm 2,1\%$ ($MW \pm SEM$) detektiert werden, wogegen die Autofluoreszenz ohne DAF-FM-DA-Injektion bereits zu diesem Zeitpunkt einen Abfall von $5,9 \pm 2,2\%$ ($MW \pm SEM$) zeigte. Beide Versuchsgruppen unterschieden sich bereits zu diesem Zeitpunkt signifikant ($p=0,039$). Bis zur 15. Minute der NIR-Bestrahlung fand ein weiterer leichter Anstieg der Fluoreszenz in den DAF-FM-DA-behandelten Hirnschnitten statt (Abb.26). Dabei steigerte sich der mittlere Grauwert der ausgewählten Zellen um $2,2 \pm 2,6\%$ ($MW \pm SEM$) verglichen mit der Baseline. Verglichen damit ist die Autofluoreszenz zu diesem Zeitpunkt bereits um $11,0 \pm 2,1\%$ ($MW \pm SEM$) gesunken und somit signifikant niedriger ($p=0,002$).

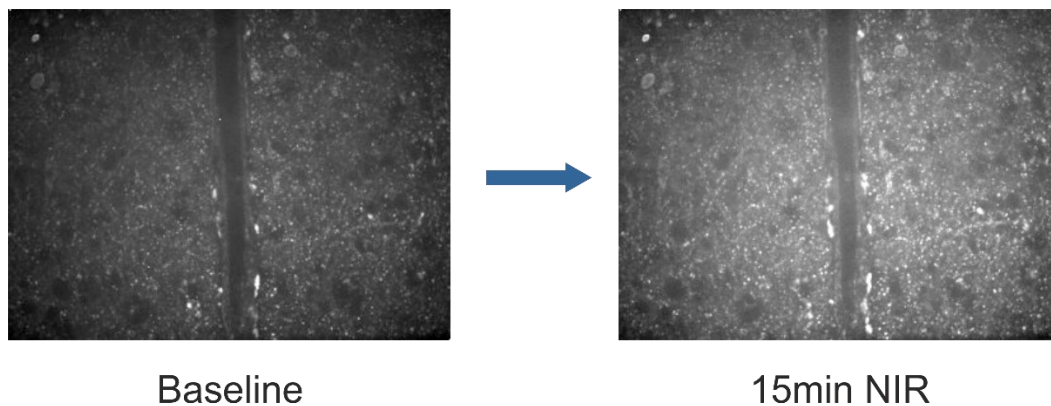


Abb.26: Beispielbilder für Fluoreszenzaufnahmen einer penetrierenden Arteriole in einem DAF-FM-DA-gefärbten Hirnschnitt einer C57BL/6J-Maus. Dargestellt ist eine Aufnahme vor Bestrahlung und eine Aufnahme nach 15-minütiger NIR-Bestrahlung mit Anstieg des Fluoreszenzsignals.

Nach 20 Minuten fällt die Fluoreszenz des gefärbten Hirnschnitts erstmals unter den anfänglichen Wert um $0,6 \pm 2,8\%$ ($MW \pm SEM$), unterscheidet sich dennoch stark von der Kontrollgruppe, die einen Abfall von $13,5 \pm 2,7\%$ ($MW \pm SEM$) zeigt.

Nach der gesamten Bestrahlungszeit von 30 Minuten konnte eine weitere Reduzierung der Fluoreszenz in beiden Versuchsgruppen beobachtet werden. So zeigen gefärbte Hirnschnitte eine Abnahme um $3,4 \pm 2,7\%$ ($MW \pm SEM$) und ungefärbte eine Abnahme um $18,9 \pm 2,6\%$ ($MW \pm SEM$) verglichen mit der jeweiligen Baseline. Nach diesem letzten Messpunkt zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Experimentalserien ($p<0,001$).

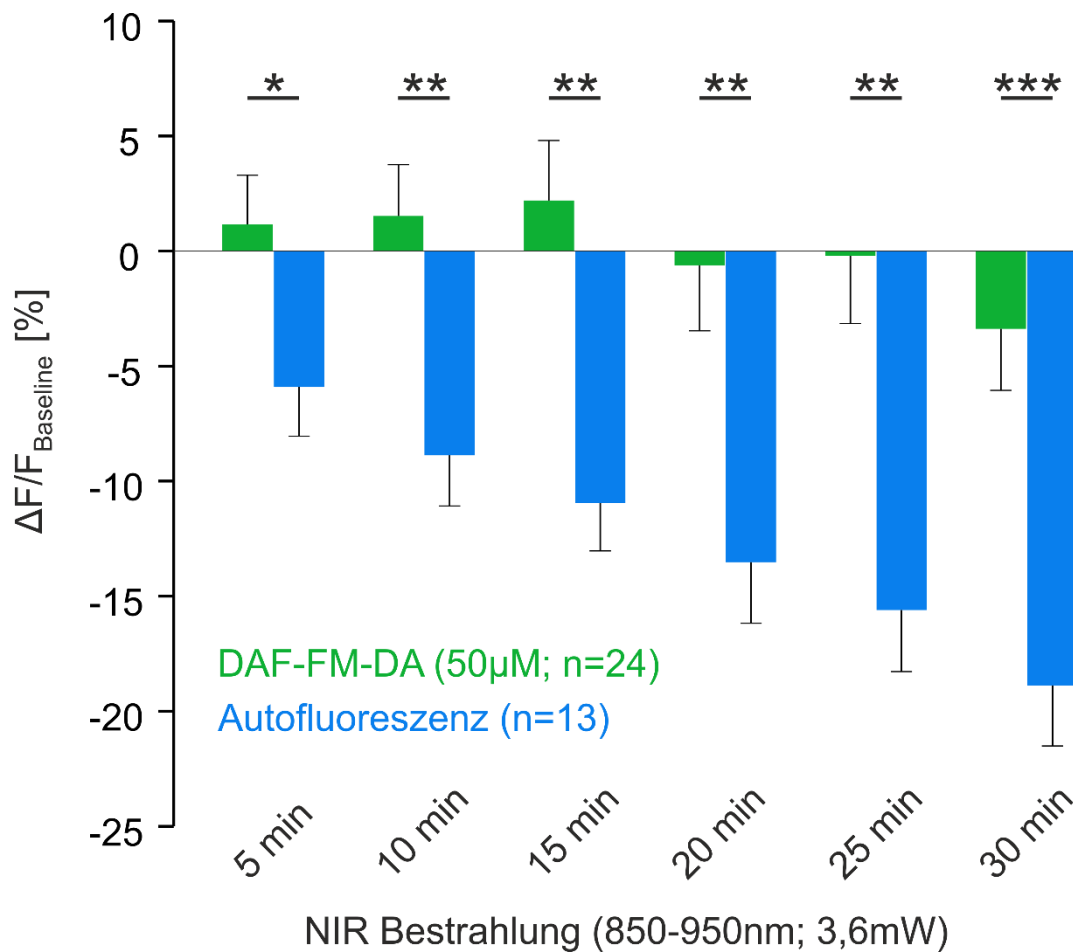


Abb.27: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzänderung bei 30-minütiger NIR-Bestrahlung (850-950nm; 3,6mW/cm²) in Hirnschnitten von C57BL/6J-Mäusen. Beobachtete Änderungen in gefärbten Hirnschnitten mit DAF-FM-DA und in ungefärbten Hirnschnitten (Autofluoreszenz). Die relative Änderung bezieht sich auf die vor der Bestrahlung aufgenommene Baseline-Periode. n = Anzahl der in den Schnitten ausgewerteten Zellen; dargestellt sind MW±SEM.

Im gesamten Zeitverlauf zeigt sich zusammengefasst eine anfängliche Steigerung innerhalb der ersten 15 Minuten, was für eine Zunahme des verfügbaren NO im Hirnschnitt spricht.

Im Gegensatz dazu konnte ein kontinuierlicher Abfall der Autofluoreszenz beobachtet werden, der zu allen Zeitpunkten signifikant stärker ausgeprägt ist im Vergleich mit den gemessenen Werten der Versuche, bei denen der Hirnschnitt mit DAF-FM-DA angefärbt wurde.

4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Folgenden sollen noch einmal kurz die wichtigsten Aussagen der Ergebnisse zusammengefasst werden.

Nachdem nachgewiesen wurde, dass stabile Versuchsbedingungen für die Bestimmung des arteriolen Durchmessers herrschen, wurde der Effekt von L-NAME über den gesamten Versuchszeitraum bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass es zu einer weiteren leichten Kontraktion kommt. Diese Ergebnisse sind von Bedeutung für die Interpretation der durch HDPs hervorgerufenen Kontraktionen und müssen in der statistischen Auswertung Berücksichtigung finden.

Die nachfolgend durchgeführten Konzentrationsstudien für Z-PDP A1/2 syn zeigten eine Abhängigkeit des kontraktiven Potentials von der Konzentration der Intermediate. Dabei konnte erst bei einer Konzentration von $0,5\mu\text{M}$ eine signifikante Kontraktion hervorgerufen werden, die sich bei einer Erhöhung auf $5\mu\text{M}$ nicht mehr steigerte.

Für Z-BOX A syn konnte ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden. Allerdings führte hier erst eine Konzentration von $5\mu\text{M}$ zu einer signifikanten Verringerung des arteriolen Durchmessers.

Alle Einzelisomere der Propentdyopents induzierten eine Verengung der Gefäßweite. Lediglich für das Isomer PDP B1 war diese Kontraktion nicht signifikant zur Kontrollgruppe. Dabei fiel auf, dass insgesamt die PDP A-Isomere eine stärkere Wirkung zeigten. Außerdem induzierten PDP A2 und B2 eine stärkere Kontraktion als ihr jeweiliges Partnerisomer.

Der Effekt des *E*-konfigurierten BOX A syn konnte keine signifikante Kontraktion hervorrufen und wirkte somit schwächer als Z-BOX A.

BOX C dagegen konnte ähnlich wie BOX A und BOX B eine signifikante Kontraktion in Slo1-Wildtyp-Mäusen hervorrufen, allerdings blieb dieser Effekt in den Slo1-Knockout-Mäusen aus. Daraus kann geschlossen werden, dass der hervorgerufene Effekt abhängig von der Expression des BK-Kanals ist.

Die Bestrahlung einer Arteriole mit Nahinfrarotlicht führte zu einer signifikanten Dilatation. Außerdem stellte sich heraus, dass eine NIR-Bestrahlung verschiedener HDPs nicht zu einem Zerfall dieser führt.

Zuletzt ging aus den Versuchen hervor, dass eine Bestrahlung mit NIR-Licht zu einer erhöhten Fluoreszenz innerhalb der ersten 15 Minuten, bei einem DAF-FM-DA gefärbten Hirnschnitten führt. Dieser Effekt scheint nicht durch Prozesse der Autofluoreszenz beeinflusst worden sein.

5. Diskussion

5.1 Methoden

5.1.1 Mausmodell

Die Maus als Modellorganismus bietet sich in diesem Stadium der Grundlagenforschung zum möglichen Pathomechanismus des zerebralen Vasospasmus an, da durch eine hohe Ähnlichkeit des murinen und humanen Genoms mit hoher Wahrscheinlichkeit Rückschlüsse auf den Menschen gezogen werden können. Eine kurze Reproduktionszeit und die gute Haltungsmöglichkeit erwiesen sich für die Experimentalserien als praktikabel. Außerdem können auf diese Weise die gewonnenen Ergebnisse mit vorher erhobenen Daten besser verglichen werden, da auch diese größtenteils an Mäusen durchgeführt wurden.

Ein gezielter Knockout des für den BK-Kanal zuständigen Slo1-Gens ist im Mausmodell möglich und dient der besseren Abschätzung des Wirkmechanismus der HDPs. Der verwendete konventionelle Knockout könnte durch einen konditionalen Knockout ausgetauscht werden, bei dem der BK-Kanal spezifisch in glatten Gefäßmuskelzellen ausgeschaltet wird. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei einem Mausstamm mit einem Knockout des BK-Kanals in glatten Muskelzellen, dieser in anderen Geweben, wie z.B. neuronalem Gewebe, vollkommen unverändert vorliegt und seine Funktion erfüllen kann (Sprossmann et al. 2009). Wichtig ist dies, da der BK-Kanal ebenfalls in Neuronen und Astrozyten vorkommt, hier Funktionen in der synaptischen Übertragung erfüllt und so in die neuronal-vaskuläre Kopplung miteingebunden ist (Girouard et al. 2010). Des Weiteren finden im konditionalen Knockout keine gegenregulatorischen Prozesse statt, die für den konventionellen Knockout typisch sind. So fehlt die Herunterregulierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und die erhöhte Expression der Proteinkinase A (Sprossmann et al. 2009). Insgesamt scheint der konditionale Knockout eine gute Möglichkeit zu sein, um den Effekt der HDPs spezifischer auf ihre Wirkung an den Gefäßen beurteilen zu können. Dieser stand allerdings zum Zeitpunkt der Experimente leider nicht zur Verfügung.

Die Auswahl der Jungtiere in einem Alter zwischen 20 und 31 Tagen begründet sich in der guten Präparationsmöglichkeit zu dieser Zeit auf Grundlage von Erfahrungswerten. Vorher sind die Gefäße im Gehirn noch nicht ausreichend für die

Untersuchungen entwickelt. Bei älteren Tieren verknöchert dagegen die Schädeldecke mehr und mehr, sodass das Hirngewebe schwieriger zu erreichen ist. Des Weiteren ist junges Gewebe toleranter bei Ischämiezeiten, was zu einer besseren Qualität der Hirnschnitte nach der Präparation führt.

Die Entscheidung über den visuellen Kortex als Zielregion wurde aufgrund der frühen Entwicklung dieses Hirnareals getroffen. Mit der Augenöffnung am 12. Tag postnatal wird die Funktionalität des visuellen Kortex voll entfaltet, weshalb von einer guten Vaskularisierung ausgegangen werden kann. Die Wahl von Koronarschnitten ermöglichte den Längsanschnitt der penetrierenden Arteriolen, die senkrecht zur Kortexoberfläche in die Tiefe ziehen.

5.1.2 Reinheit der HDPs

Die hohe Lichtsensibilität und die schnelle Möglichkeit zur Isomerisierung sind Faktoren, die sich auf die Aussagekraft der Ergebnisse auswirken könnten. Durch die Entnahme von Proben wurde dies postexperimentell getestet. Vorherige Versuchsreihen zeigten, dass eine Aufbewahrung von BOX A, BOX B und den PDPs in ihrer Z-Konfiguration bei -20°C in wässriger Lösung wie aCSF ausreichend ist, um die nötige Stabilität zu gewährleisten. Da über BOX C und E-BOX A im Vorfeld wenig bekannt war, wurden diese Proben bei -80°C zur Aufbewahrung eingefroren, um das Risiko einer Veränderung möglichst gering zu halten. Auch bei biologischen Proben, wie z.B. Liquor oder Galle sollte eine Lagerung bei -80°C durchgeführt werden, da diese nach Erfahrungen des IAAC Jena einen weiteren Abbau der Substanzen bei -20°C zeigen.

Insgesamt konnte für alle Experimentalserien eine Stabilität der jeweiligen HDPs nachgewiesen werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die beobachteten Effekte nicht durch Abbauprozesse oder Isomerisierung beeinflusst wurden.

Auch wenn die in 4.4 gezeigten Faktoren für PDP B deutlich niedriger sind, als die für PDP A, sollten auch diese bei den verwendeten Konzentrationen ausreichend sein, um den reinen Effekt der verwendeten Substanz beobachten zu können.

5.1.3 Vorspannung mit L-NAME und Versuchsdesign

Das gewählte *in vitro*-Versuchsdesign kommt in vielen Teilbereichen, in einem begrenzten zeitlichen Rahmen, dem lebenden Organismus sehr nahe. Die gewählten Zeiten für die Perfusion mit den HDPs wurden limitiert durch die Lebensdauer der Hirnschnitte und die damit verbundene Bildqualität. Ziel war es den Effekt möglichst lange zu beobachten, ohne dass der Schnitt in seiner Vitalität beeinträchtigt wird. Kontrolliert wurde dies am Ende mit der Applikation von 5µl Noradrenalin-Lösung (1g/ml). Noradrenalin (NA) als starker Vasokonstriktor sollte beim noch lebenden Schnitt eine weitere Kontraktion hervorrufen können. Die Entscheidung einen Schnitt aus den Ergebnissen auszuschließen, bei negativer NA-Kontrolle begründet sich darin, dass der Zeitpunkt, ab dem das Gefäß nicht mehr zur Kontraktion fähig war, rückblickend schlecht bestimmt werden kann. In diesem Fall besteht auch die Möglichkeit, dass die eingewaschene Substanz in ihrem kontraktilen Potential beeinträchtigt wurde. Bei einem gesamten Beobachtungszeitraum von 145 Minuten wird der akute Effekt der HDPs getestet, nicht jedoch der Langzeiteffekt über mehrere Stunden oder Tage. Um diese Fragestellung suffizient zu klären, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Da sich die Lebensdauer eines Hirnschnittes nicht für langfristige Untersuchungen eignet, wären Experimente am *in vivo* Modell denkbar. Möglich sind Versuchsreihen, bei denen das Versuchstier unter sterilen Bedingungen Eigenblut oder auch HDPs in gereinigter Form in den Subarachnoidalraum injiziert bekommt. Mithilfe einer MRT könnte der zerebrale Blutfluss durch wiederholte Messungen ermittelt werden und so der Effekt der Substanzen über mehrere Tage oder Wochen beobachtet werden.

Um die Reaktivität von Gefäßen zu untersuchen, fehlt im akuten Hirnschnitt der aktive Blutfluss mit resultierendem Blutdruck. Die dadurch hervorgerufene Vorspannung des Gefäßes ist essentiell für die myogene Autoregulation der Arteriolen (vgl. Bayliss-Effekt, Kapitel 1.2.2). Fehlt diese grundlegende mechanische Belastung, bleibt eine Erregung der glatten Gefäßmuskelzelle aus und sie geht in den relaxierten Zustand über. Wird ein derart relaxiertes Gefäß als Ausgangssituation gewählt, kann durch Blockierung des BK-Kanals mit dem potenten BK-Kanal-Inhibitor Iberiotoxin keine Kontraktion hervorgerufen werden, obwohl diese zu erwarten wäre (Joerk et al. 2014). Als eine Möglichkeit die Vorspannung der Arteriolen zu erhöhen, wurde der NO-Synthase-Inhibitor L-NAME

ausgewählt, welcher bereits in vorangegangenen Studien zur Durchführung ähnlicher Experimente genutzt wurde (Joerk et al. 2014). Besonders eine Blockierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), die NO vor allem für die Vasodilatation produziert, ist von zentraler Bedeutung. Aber auch die neuronale NO-Synthase (nNOS) wird durch L-NAME inhibiert (Mülsch und Busse 1990, Rees et al. 1990, Moore et al. 1991). Durch das Fehlen von Stickstoffmonoxid bleibt die Aktivierung der relaxierenden Signalkaskade über die lösliche Guanylatzyklase aus (vgl. Kapitel 1.5.2). Einer Relaxierung der Gefäße wird auf diese Weise entgegengewirkt und es kommt zum gewünschten Effekt der Vorspannung, mit der ein anliegender Blutdruck simuliert wird. Des Weiteren tritt im Pathomechanismus des Vasospasmus ebenfalls ein funktioneller Mangel an NO im Gehirn auf (vgl. Kapitel 1.4.1), sodass sich den Bedingungen *in situ* angenähert wird. Mit diesen Ausgangsbedingungen konnte durch Iberiotoxin eine Vasokonstriktion hervorgerufen werden (Joerk et al. 2014).

Im Versuchsdesign wurden die Hirnschnitte auf Grundlage dessen 45 Minuten in der mit L-NAME versetzten Lösung inkubiert. Die Zeitspanne ergibt sich aus den in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Ergebnissen. Nach dieser Zeit zeigt sich kaum eine weitere Veränderung des Durchmessers. Es stellt sich ein vorübergehendes Plateau ein (vgl. Abb.14), welches als Baseline für die nachfolgende Substanzeinwaschung dient. Im weiteren Verlauf des Experiments stellt sich allerdings immer noch die Frage, ob ein Teil der beobachteten Kontraktionen durch das L-NAME hervorgerufen wird. Die deshalb durchgeführten Versuche zum Effekt von L-NAME über den gesamten Zeitraum von 145 min zeigten, dass es sowohl in WT-, als auch in KO-Mäusen zu einer weiteren Kontraktion nach dem eingestellten Plateau kommt. Der Effekt, den eine eingewaschene Substanz hervorruft, kann also nicht als einzig durch diese hervorgerufen eingestuft werden. Deshalb wurde in der statistischen Auswertung die beobachtete Kontraktion stets mit der verglichen, die L-NAME alleine verursachen konnte. Eine Kontraktion wurde erst dann als solche eingestuft, wenn der Effekt signifikant stärker war, als der nur durch L-NAME alleine hervorgerufene. Die beobachtete Vasoaktivität der HDPs ist demnach nicht vollständig durch diese verursacht, sondern wird zum Teil vom L-NAME beeinflusst. Aufgrund der benötigten Vorspannung kann auf diesen Schritt allerdings im *in vitro*-Modell vorerst nicht verzichtet werden. Da die statistische Auswertung allerdings den Vergleich anstellt, ob eine beobachtete Kontraktion stärker ist, als eine allein durch L-NAME verursachte, kann davon ausgegangen werden, dass eine signifikant stärker

beobachtete Kontraktion tatsächlich auf die Wirkung der HDPs zurückgeführt werden kann. Dies wird zusätzlich durch Versuche am *in vivo*-Modell gestützt. Hier kann bei physiologisch anliegendem Blutdruck ein Effekt der HDPs auch ohne die Applikation von L-NAME oder anderen konstriktorisch wirkenden Substanzen beobachtet werden (Joerk and Ritter et al. 2018).

5.1.4 Nachweis der NO-Freisetzung mittels DAF-FM-DA

Der Nachweis von freiem NO mithilfe eines Farbstoffs aus der DAF-Familie wurde bereits in einigen Studien angewendet (Brown et al. 2000, Xu und Krukoff 2007). Dabei fiel die Entscheidung aufgrund des breiteren pH-Bereichs (>5,5) auf die Farbstoffe der DAF-FM Gruppe. Im Gegensatz dazu sind Farbstoffe der DAF-2 Gruppe nur bei pH-Werten >7 zu gebrauchen. Die Farbstoffe sind in dieser herkömmlichen Konfiguration verfügbar, allerdings auch als Diacetat (DAF-FM-DA), was es zellgängig macht, sodass die intrazelluläre NO-Verfügbarkeit angezeigt wird. Da in dieser Arbeit das NO, welches sich in glatten Gefäßmuskelzellen und Neuronen anreichert, betrachtet werden soll, schien der Farbstoff DAF-FM-DA der geeignetste zu sein.

Der Farbstoff wurde, wie unter 3.7.3 beschrieben, mithilfe einer Glaspipette lokal in das Hirngewebe injiziert. Diese Entscheidung erfolgte aufgrund der Vorerfahrungen in der Arbeitsgruppe mit dem Farbstoff Oregon Green Bapta 1, der zum Ca^{2+} -Imaging verwendet wird. Andere Studien beschreiben ein Umspülen und Inkubieren des Präparates mit der Farbstofflösung, sodass das gesamte Präparat gefärbt wird (Brown et al. 1999). Da NO als freies Radikal generell in sehr kleinen Konzentrationen im lebenden Gewebe vorkommt und sehr kurzlebig ist, ist sein Nachweis grundsätzlich bereits schwierig und könnte durch die Diffusion weiter benachteiligt werden. Außerdem könnte die direkte Injektion zu einer hohen lokalen DMSO-Konzentration führen, welches als Lösungsmittel dient. Bei zu hohen Konzentrationen könnte dies zu einem Absterben der Zellen führen, sodass das Gewebe nicht mehr voll funktionsfähig ist. In den durchgeführten Versuchen scheint jedoch die Mehrzahl der Zellen noch vital zu sein, weshalb an dieser Stelle nicht davon ausgegangen wird, dass diese durch das DMSO geschädigt wurden. Eine mögliche Verbesserung der Bilder durch Umspülen mit der Farbstofflösung müsste

durch weitere Experimentalserien versucht und mit den vorherigen Ergebnissen verglichen werden. Auf der anderen Seite kann es beim Umspülen des Hirnschnitts dazu kommen, dass der Farbstoff nur unzureichend aufgenommen werden kann, da sich nach dem Schnitt des neuronalen Gewebes eine oberflächliche gliöse Narbe bilden kann, die als Barriere fungiert. Deshalb eignet sich diese Methode nur für frisch geschnittene Hirnschnittpräparate.

Weiterführend gilt es die Einstellungen des Lasers und der Aufnahme zu diskutieren. Aufgrund einiger Vorversuche war das Ziel die Laserpower herunterzusetzen, um das beobachtete Bleaching des Farbstoffs so gering wie möglich zu halten. Daraus resultierte eine höhere Expositionszeit der Kamera für eine Aufnahme, da die gemessenen Fluoreszenzen sehr klein waren und nur so gut festgehalten werden konnten. Natürlich wird dadurch auch das Hintergrundrauschen erhöht und ist hier sicherlich ein Störfaktor in der Auswertung. Bei höherer Laserintensität wären die Signale um einiges stärker gewesen, allerdings fand sich hier ein rascher Bleaching-Effekt, sodass eine Aussage über einen möglichen Anstieg des NO-Levels nicht möglich war. Eine Erhöhung der Fluoreszenz und damit eine Verbesserung der Bildqualität wäre wünschenswert, um den Effekt eventuell besser beurteilen zu können. Die Frage, ob ein Umspülen des Hirnschnitts die Bildqualität verbessert, müsste im Nachhinein untersucht werden. Außerdem muss geschaut werden, ob eine bessere Abstimmung zwischen Laserintensität und Belichtungszeit gefunden werden kann, um mögliche Bleaching-Effekte so gering wie möglich zu halten. Das kontinuierliche Abfallen der Fluoreszenz in den Autofluoreszenz-Versuchen zeigt, dass hier noch kein Optimum gefunden ist, sodass der beobachtete Effekt eventuell noch größer ausfallen könnte.

Die Beschränkung auf den Kortex als Zielregion begründet sich in der besseren Beziehung zu den Experimenten, bei denen der Durchmesser der Arteriolen beobachtet wurde. In diesem Bereich befinden sich sowohl Neurone, als auch die glatten Gefäßmuskelzellen der penetrierenden Arteriolen. In der Auswertung wurden diese beiden Zelltypen untersucht, da davon ausgegangen wird, dass eine lokale NO-Freisetzung zu einer Anreicherung sowohl in glatten Gefäßmuskelzellen, als auch in Neuronen führt. Deshalb wird an dieser Stelle davon ausgegangen, dass beide Zelltypen als potentieller Indikator für einen NO-Anstieg gebraucht werden können.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Effekt von L-NAME über 145 Minuten

Wie bereits in Abschnitt 5.1.3 beschrieben, konnte eine weitere Kontraktion durch L-NAME nach dem eingestellten Plateau beobachtet werden, welches bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt wurde.

Eine mögliche Erklärung sind die limitierten metabolischen Reserven im *in vitro*-Hirnschnittmodell, die mit laufender Experimentierzeit verbraucht werden, aber nicht wieder suffizient aufgefüllt werden können. Die drei im lebenden Hirngewebe aktiven NO-Synthasen katalysieren die gleiche Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin, bei der NO abgespalten wird (Marletta 1989). L-NAME inhibiert sowohl die neuronale, als auch die endotheliale, nicht jedoch die induzierbare NO-Synthase. Die Stickstoffmonoxid-Produktion wird somit reduziert, jedoch nicht vollständig unterbunden. Es ist nun denkbar, dass während des Experiments die metabolischen Reserven an L-Arginin aufgebraucht werden und parallel dazu die Enzymaktivität nachlässt. Somit kommt es nach einem anfänglichen Abfall der NO-Verfügbarkeit durch das L-NAME zu einer weiteren Reduktion des produzierten Stickstoffmonoxids, da die induzierbare NO-Synthase in ihrer Produktion eingeschränkt wird. Folglich entsteht durch Fehlen des Vasodilatators reaktiv eine weitere Kontraktion des Gefäßes.

Auffällig war der Unterschied zwischen den Slo1-Wildtyp- und -Knockout-Mäusen. Auch wenn sich zwischen den beiden keine Signifikanz ergibt, zeigten die KO-Tiere eine höhere Reaktivität auf das L-NAME als die Wildtypen. Grund hierfür könnte sein, dass durch den Knockout ein Defizit in der vaskulären Autoregulation resultiert. Zu erkennen ist dies bereits am erhöhten Blutdruck, der bei den Mäusen nachgewiesen werden konnte (Sausbier et al. 2004). Da der BK-Kanal natürlicherweise einer Kontraktion durch Hyperpolarisation entgegenwirken würde (vgl. Kapitel 1.2.2), kann gefolgert werden, dass bei Fehlen dieses Mechanismus, eine stattfindende Kontraktion stärker ausfällt. Die physiologische Gegenregulation fehlt an dieser Stelle.

5.2.2 Konzentrationsabhängigkeit der HDPs

Die in Abschnitt 4.3 gezeigte Konzentrationsabhängigkeit zeigt sich sowohl für Z-PDP A1/2, als auch für Z-BOX A.

Bei Betrachtung der PDP-Gruppe fällt auf, dass für die kleinste untersuchte Konzentration ($0,05\mu\text{M}$) keine Kontraktion festgestellt werden konnte, die über die durch L-NAME verursachte Gefäßverengung herausgeht. Es kann gefolgert werden, dass PDPs alleine derart niedrig konzentriert nicht vasodynamisch wirksam werden oder ein sehr gering ausgeprägter Effekt vom L-NAME überschattet wird. Sowohl $0,5\mu\text{M}$, als auch $5\mu\text{M}$ verursachten dagegen eine signifikante Kontraktion. Die kleinste wirksame Konzentration scheint folglich im Bereich von $0,05 - 0,5\mu\text{M}$ zu liegen. Interessanterweise kann zwischen $0,5\mu\text{M}$ und $5\mu\text{M}$ keine weitere Steigerung der konstriktiven Wirkung beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass bereits bei $0,5\mu\text{M}$ eine Sättigung des Effekts erreicht ist und durch Erhöhung der zugegebenen Stoffmenge, keine zusätzlichen Bindestellen mehr blockiert werden können. In diesem Fall läge nicht nur die kleinste wirksame Konzentration, sondern auch die Konzentration, bei der bereits ein maximaler Effekt beobachtet werden kann zwischen $0,05$ und $0,5\mu\text{M}$. Die Spanne, in der die PDPs eine konzentrationsabhängige Steigerung ihrer Effektivität zeigen, scheint sich somit auf diesen Bereich zu beschränken. Gegen die Erwartungen zeigte sich bei $0,5\mu\text{M}$ eine größere Gefäßverengung als bei $5\mu\text{M}$. Die Ergebnisse unterscheiden sich dabei nicht signifikant, sodass die Streuung der Messwerte im biologischen System als Erklärung herangezogen werden kann. Möglich wäre aber auch, dass es durch eine erhöhte Konzentration oberhalb der maximalen Wirkung zu einer gegenseitigen Hemmung der Moleküle kommen kann, da sie gegenseitig um die Bindungsstelle konkurrieren. In der Enzymkinetik existiert ein ähnliches Phänomen, bei dem es zu einer Abnahme der Enzym-Umsatz-Geschwindigkeit bei Substratüberschuss kommt. Dieses Verhalten ist eines der häufigsten Abweichungen von der Michaelis-Menten-Kinetik (Kühl 1994, Yoshino und Murakami 2015). In anderen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte in Kooperation mit dem IAAC gezeigt werden, dass die Konzentration von PDPs im Liquor von SAB-Patienten bei durchschnittlich $0,745\mu\text{M}$ liegt (Joerk und Ritter et al. 2018). Diese Messung liegt in einer Größenordnung der hier untersuchten $0,5\mu\text{M}$, die bereits eine maximale Kontraktion hervorrufen konnte. Die Aussage, dass PDPs beim Patienten in ähnlich hohen Konzentrationen

vorkommen, die auch vasoaktiv wirksam sind, unterstützt die These, dass sie Einfluss auf die Entstehung des zerebralen Vasospasmus nehmen können. Allerdings unterscheiden sich die PDP-Konzentrationen bei Patienten die einen Vasospasmus erleiden nicht von denen, die keinen entwickeln. Das Vorkommen von HDPs im Liquor scheint also nicht alleinig dafür verantwortlich zu sein, dass es zu dieser Komplikation kommt. Wie in Abschnitt 1.4.1 handelt es sich wahrscheinlich um ein multifaktorielles Geschehen, bei dem mehrere pathophysiologisch wirksame Prozesse zusammenkommen.

Z-BOX A zeigte ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit, wobei neben 0,05µM bei dieser Substanz auch 0,5µM keine signifikante Kontraktion hervorrufen konnte. Auch, wenn die Gefäße im Durchschnitt bei Applikation von 0,5µM sich etwas mehr verengten, existiert kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Erst 5µM konnten eine deutlich signifikante Kontraktion hervorrufen. Die minimal wirksame Konzentration scheint folglich im Größenbereich zwischen 0,5 und 5µM zu liegen. Die Dosis, bei der ein maximaler Effekt erreicht wird, kann aus den vorhandenen Daten nicht bestimmt werden, da ein weiterer Zuwachs bei höheren Konzentrationen möglich ist. Weitere Experimente müssten an dieser Stelle angeschlossen werden. Wichtiger ist allerdings die Rolle der BOXes in Bezug auf die im Patienten vorkommenden Konzentrationen. Bei Patienten mit einem zerebralen Vasospasmus lag die Konzentration für BOX A bei 0,020 µM und die für das hier nicht untersuchte BOX B bei 0,016µM (Joerk und Ritter et al. 2018). Diese Werte entsprechen ungefähr der in den Experimenten kleinsten getesteten Dosis, bei der keine Kontraktion gezeigt werden konnte. Selbst bei einer Größenordnung darüber trat keine Kontraktion auf. Auf Grundlage dieser Ergebnisse muss der Einfluss der BOXes auf die Entstehung des Vasospasmus kritisch betrachtet werden, da sie nicht in wirksamen Konzentrationen im Liquor vorkommen. Selbst die Addition von BOX A und BOX B würde in diesem Fall nicht ausreichen. Es stellt sich die Frage, ob nun die PDPs in den Fokus der weiteren Untersuchungen gerückt werden sollten. Eindeutig ist, dass PDPs bei kleineren Konzentrationen eine Gefäßverengung bewirken können und außerdem in diesen wirksamen Dosen im Liquor nachgewiesen werden konnten, was bei BOX A nicht der Fall ist. Eine Fokusverlagerung scheint hier also sinnvoll zu sein, jedoch sollten auch die BOXes nicht vollständig außer Acht gelassen werden. Messungen in Kontrollpatienten konnten zeigen, dass keine BOXes im Liquor vorkommen, wenn keine SAB

stattgefunden hat, somit treten sie erst mit der stattgefundenen Blutung auf. (Joerk und Ritter et al. 2018).

Da, anders als im verwendeten *in vitro*-Modell, die HDPs im Patienten nicht in aufgereinigter Form einzeln, sondern als Gemisch vorkommen, sind mögliche Interaktionen und additive Effekte zumindest denkbar. Zum Nachweis müssten nachfolgend Untersuchungen folgen, die die Interaktion der HDPs begutachten. BOX A ist an sich eine Substanz, die eine gefäßverengende Wirkung erzeugen kann (Joerk et al. 2014), ihre Bedeutung im Pathomechanismus des Vasospasmus ist aber keine alleinige Rolle, sondern wahrscheinlich ein Zusammenspiel aus vielen potentiell vasokonstriktiv wirkenden Substanzen.

5.2.3 Effekt der PDP-Einzelisomere

Die vier Einzelisomere PDP A1, A2, B1 und B2 wurden bis zum Beginn dieser Arbeit noch nicht auf ihre Einzelwirkung untersucht. Im Gemisch konnte allerdings schon im Vorfeld ein konstriktives Potential nachgewiesen werden (Günther 2017). Alle Einzelisomere konnten im Versuch eine Verringerung des arteriolen Durchmessers bewirken, die sich signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden, mit Ausnahme von PDP B1. Dieser Umstand könnte der im Vergleich großen Standardabweichung der Versuchsreihe geschuldet sein. Grundsätzlich fällt auf, dass es Unterschiede in der Wirksamkeit zwischen den Isomeren gibt. PDP A2 und B2 wirken stärker, als ihr jeweiliges Partnerisomer. Außerdem scheinen die A-Isomere insgesamt einen größeren Effekt zu haben, als die B-Isomere. Hierbei ergibt sich allerdings keine Signifikanz. Es stellt sich die Frage, woran die unterschiedliche Wirkstärke liegen könnte. Als Möglichkeit ergibt sich die Bedeutung der Methyl- und Vinylgruppe, sowie der Positionen der OH-Gruppen am Molekül. Während PDP A1 und B1 eine OH-Gruppe am C5-Atom aufweisen, befindet sich diese bei PDP A2 und B2 am C7-Atom. Eine Abhängigkeit der Interaktion mit der Zielregion von der Position der OH-Gruppe ist durchaus denkbar. Die Bindung am BK-Kanal und damit seine Inhibition könnte bei PDP A2 und B2 stärker ausgeprägt sein, was eine bessere Wirkweise erklären könnte. Problematisch ist allerdings, dass bisher nicht untersucht wurde, ob und an welcher Stelle des BK-Kanals die PDPs binden und in Interaktion mit diesem treten. Für BOXes konnte ein Bindungsmotiv in der RCK1-Domäne identifiziert

werden (Hou et al. 2011). Ob die PDPs an das gleiche Motiv binden oder eine andere Sequenz dafür nutzen, ist nicht geklärt. Versuche an Slo1-KO-Mäusen legen aber nahe, dass die PDPs zumindest über eine Inhibition des BK-Kanals ihre Wirkung entfalten. Die bei Wildtypen beobachtete Kontraktion blieb in Mäusen, bei denen der BK-Kanal nicht exprimiert wurde aus (Günther 2017).

Ein weiterer Punkt, der nicht den Erwartungen entsprochen hat, ist, dass das Einzelisomer A2 eine größere Kontraktion hervorrufen, als die im Vorfeld getesteten Gemische PDP A1/A2 und PDP B1/B2. Die anderen Einzelisomere unterscheiden sich in ihrer Effektstärke jedoch statistisch nicht vom Gemisch. Der erwartete additive Effekt der PDPs bleibt an dieser Stelle demnach aus. Möglicherweise handelt es sich hier um eine Art kompetitive Hemmung zwischen den Einzelisomeren, die um ihre Bindungsstelle konkurrieren und sich deshalb als Gemisch gegenseitig in ihrer Funktion behindern. Um diese These weiter zu stützen, müssten dennoch weitere Experimente zu den Einzelisomeren durchgeführt werden, um die hier gezeigten Ergebnisse ausreichend zu validieren.

5.2.4 Wirkverlust bei Umwandlung von Z-BOX A zu E-BOX A

Das durch Bestrahlung umgewandelte *E*-BOX A konnte keine signifikante Kontraktion in einer Arteriole bewirken. Der Wirkverlust ließe sich mit einer Affinitätsminderung zur Bindungsdomäne am BK-Kanal durch Strukturänderung erklären. Dadurch kommt der Doppelbindung zwischen dem C5- und C6-Atom eine zentrale Bedeutung zu, wenn es um die Interaktion mit dem BK-Kanal geht. Die Stellung der Substituenten scheint hier Einfluss auf den beobachteten Effekt zu haben. Ob diese Schlussfolgerung für alle HDPs und ihre *E*-konfigurierten Isomere gilt, kann an dieser Stelle noch nicht abschließend gesagt werden, allerdings ist dies durchaus vorstellbar. Gerade in Bezug auf BOX B würde ein ähnliches Verhalten erwartet werden. Für die Intermediate des Stoffwechselweges müsste dies aber noch einmal untersucht werden.

Es kommt die Frage auf, ob man sich diesen Wirkverlust therapeutisch zu Nutze machen könnte. Wenn die Bestrahlung der HDPs zu deren Wirkverlust führt, könnte eventuell ein durch diese Substanzen verursachter Vasospasmus durch eine Trans-Isomerisierung aufgehalten werden. Allerdings müsste hierfür die Frage geklärt

werden, ob bei PDPs derselbe Effekt zu erwarten wäre, da diese laut den erhobenen Ergebnissen eine größere Rolle in der Durchmesserregulation innehaben. Des Weiteren muss die Bestrahlung, wenn sie am Patienten angewendet wird, auch intrakranial zu einer Konformationsänderung führen können. Das Spektrum der verwendeten Xenon-Lampe ist breit gefächert und entspricht ungefähr dem des Sonnenlichts. Zur Konformationsänderung führen wahrscheinlich Wellenlängen im Bereich der Absorptionsmaxima von BOX A bei 309 und 206nm, also im UV-Bereich. Insgesamt steigt die Penetrationstiefe mit zunehmender Wellenlänge. Es wurde bisher angenommen, dass eine Bestrahlung von HDPs zu einer Degradation dieser führt (Wurster et al. 2008). Außerdem konnten mit UV-Licht bestrahlte BOXes schon früher keine konstriktorische Wirkung mehr entfalten (Jörk 2013). Auch dies wurde auf einen photostimulierten Abbau der BOXes zurückgeführt. Durch die vorliegenden Ergebnisse muss jedoch auch darüber nachgedacht werden, ob es durch die Bestrahlung nicht zu einer kompletten Degradation der HDPs, sondern vielmehr zu einer Konformationsänderung in die *E*-Form, mit resultierendem Wirkverlust, gekommen ist. Wenn nun dieser UV-Anteil im Licht für die Umwandlung verantwortlich ist, wäre eine Bestrahlung des Kopfes eines SAB Patienten höchstwahrscheinlich nicht ausreichend, um die *E*-Konformation der HDPs herbeizuführen, da UV-Licht im Vergleich zum Infrarotlicht eine geringe Eindringtiefe ins Gewebe hat, sodass sehr hohe Intensitäten nötig wären. Aufgrund der stark gewebsschädigenden Wirkung des UV-Lichts ist eine solche Anwendung ohnehin nicht denkbar. Die Frage, die sich aus diesen Ergebnissen ergibt, ist, ob die konstriktorisch wirkenden *Z*-Isomere ihre Wirkung am BK-Kanal entfalten können, wenn vorher bereits *E*-Isomere gebunden haben. Hierzu müsste geklärt werden, ob die *E*-Isomere die gleiche Region des BK-Kanals binden und lediglich keine Wirkung entfalten, oder ob sie durch die Konformationsänderung ihre Bindefähigkeit verloren haben. In ersterem Fall wäre eine prophylaktische intrathekale Gabe von *E*-BOX A denkbar, bevor die *Z*-Isomere durch den Hämabbau entstehen. Im *in vitro*-Modell wäre eine Untersuchung, bei der *E*-BOX A vor *Z*-BOX A gegeben wird, gut umsetzbar und eine mögliche Verhinderung der Kontraktion könnte auch hier beobachtet werden.

5.2.5 Wirksamkeit von BOX C auf zerebrale Arteriolen

Die neu entdeckte Substanz BOX C zeigte im Vergleich mit BOX A und BOX B keinen Unterschied in Bezug auf die Vasoaktivität. Es konnte gezeigt werden, dass eine Abhängigkeit von der Expression des BK-Kanals besteht, da im Slo1-Knockout keine Kontraktion hervorgerufen werden konnte. Ebenso wie bei den PDPs ist es allerdings fraglich, ob BOX C das gleiche Bindungsmotiv nutzt, wie BOX A und BOX B. Hierfür fehlt der nötige Nachweis. Gerade, da die Struktur von BOX C sich deutlich von der der anderen BOXes unterscheidet und eher den PDPs ähnelt, ist eine alternative Bindesequenz denkbar. Da BOX C im Labor hergestellt wurde, ist die Entstehung dieser Substanz zwar möglich, allerdings wurde sie noch nicht im Liquor von Patienten mit einer SAB nachgewiesen. Dementsprechend kann zum aktuellen Zeitpunkt keine sichere Aussage darüber getroffen werden, inwieweit BOX C in der Pathophysiologie des Vasospasmus eingebunden ist.

5.2.6 Nahinfrarotbestrahlung als mögliche Therapieoption

Die Bestrahlung mit Infrarotlicht konnte bereits in der Vergangenheit positive Effekte auf das Outcome von Patienten mit einem ischämischen Schlaganfall zeigen (Lampl et al. 2007, Zivin et al. 2009). Wie in Kapitel 1.5.3 bereits beschrieben verbesserte es die Myokardperfusion von Ratten (Oron et al. 2001) und förderte die Wundheilung (Ankri et al. 2010). Eine förderliche Wirkung kann auf dieser Grundlage auch beim Vasospasmus nach einer SAB möglich sein. Die durch Lohr et al. entdeckte Freisetzung von NO aus nitrolysiertem Hämoglobin kann einige dieser positiven Effekte erklären (Lohr et al. 2009). Das vasodilatatorisch wirkende NO kann auf direktem Weg der Vasokonstriktion entgegenwirken. Der funktionelle Mangel an NO, welcher beim Pathomechanismus des Vasospasmus eine Rolle spielt (vgl. Kapitel 1.4.1), könnte durch eine erhöhte Verfügbarkeit bei Infrarotbestrahlung wieder ausgeglichen werden. Des Weiteren führt NO auf mitochondrialer Ebene zu einer verlangsamten Elektronen-Übertragung in der Atmungskette. Durch reversible Inhibierung der Komplexe I und IV in der inneren Membran der Mitochondrien wird die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) heruntergefahren und die Zelle vor oxidativem Stress geschützt (Piantadosi 2012, Chouchani et al. 2013, Burwell et al. 2009). Da durch ROS ebenfalls die Entstehung von oxidativen

Hämabbauprodukten begünstigt wird, könnte hier durch eine Reduktion ebenfalls die Menge der entstehenden HDPs reduziert werden. Ein Problem bei Erwägung einer möglichen Therapie ist wiederum die Erreichbarkeit der Liquorräume und des Hirngewebes durch Bestrahlung der Schädelkalotte. Im vergangenen Jahr konnte jedoch gezeigt werden, dass nahinfrarotes Licht den Schädelknochen durchdringen kann und das Hirngewebe erreicht (Wang et al. 2017). Die maximale Penetration kann dabei mit einer Wellenlänge zwischen 700 und 900nm erreicht werden (Wang et al. 2017). Auf anderen Applikationswegen scheint NO bereits einen positiven Einfluss auf das Outcome von SAB Patienten zu haben. Die Inhalation von NO führte in C57BL/6-Mäusen zu einer Auflösung früher pialer Vasospasmen nach stattgefundener SAB. Einen günstigen Einfluss soll es auf den entstehenden Hirnschaden und die Mortalität zu geben. Außerdem wird beschrieben, dass das neurologische Outcome nach der Inhalation verbessert sei (Terpolilli et al. 2016).

Zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zur Infrarotbestrahlung mit 850-950nm Wellenlänge lässt sich zunächst sagen, dass eine Irradiation von HDPs nicht zu deren Zerfall führt (vgl. Kapitel 4.7.2). Ein Einfluss der NIR-Strahlung beim Patienten auf die Konzentration der im Liquor gelösten HDPs kann also ausgeschlossen werden. Eine Reduktion des primären vasokonstriktorisches Potentials der HDPs ist auf diese Weise nicht möglich.

Allerdings kann durch Infrarotillumination eine Dilatation einer Arteriole in aCSF-Lösung um ca. 10% nach 60 Minuten hervorgerufen werden (vgl. Kapitel 4.7.1). Die verwendeten Wellenlängen von 850-950nm begründen sich in einer niedrigeren Absorption von Nahinfrarotlicht im Wasser als im Weitinfrarot-Bereich. Auf dieser Weise wird versucht, lokale Wärmeeffekte, die eine Vasodilatation begünstigen, zu umgehen. Eine Temperaturüberprüfung im Wasserbecken zeigte zwar keinen Anstieg der Badtemperatur über den Experimentierzeitraum, zum vollständigen Ausschluss müsste allerdings die lokale Wärmeentwicklung mit einem thermosensiblen Farbstoff nochmals überprüft werden. Die Verwendung anderer Wellenlängen wäre zusätzlich möglich, um den Effekt möglicherweise zu optimieren. So wurde gezeigt, dass die NO-Freisetzung für eine Wellenlänge von 660nm am Herzen maximal war (Keszler et al. 2014). Diese Wellenlänge liegt bereits im sichtbaren roten Bereich des Lichts. Außerdem könnte die Dauer der Experimente ausgeweitet werden, um einen längerfristigen Effekt des nahinfraroten Lichts

abzuschätzen. Die Dilatation wurde zwar zum Ende der Experimentierzeit immer schwächer, allerdings sind stärkere Effekte bei längerer Bestrahlung denkbar, gerade im *in vivo*-Modell. Im *in vitro*-Schnitt tritt das Problem auf, dass nur eine begrenzte Stoffwechsellage besteht und dementsprechend weniger NO synthetisiert wird.

Andere Experimente zeigten, dass die Bestrahlung mit Nahinfrarotlicht die durch HDPs verursachte Kontraktion effektiv verhindern kann (Sommer 2017). Die Nahinfrarotirradiation scheint also eine mögliche Therapieoption darzustellen, die zwar nicht verhindern, dass vasoaktive HDPs entstehen, aber eine scheinbar wirkungsvolle Gegenregulation hervorbringen kann.

Zuletzt wurde mithilfe des Farbstoffes DAF-FM-DA untersucht, ob durch Infrarotbestrahlung eine NO-Freisetzung im Hirngewebe stattfindet, die die beobachtete Dilatation der Arteriolen begründet. Generell muss gesagt werden, dass diese Ergebnisse als erste Untersuchungen lediglich eine Tendenz aufzeigen können und methodisch, wie unter 5.1.4 beschrieben, sicherlich weiter ausgebaut werden können.

Die Ergebnisse zeigen einen leichten Anstieg der Fluoreszenz innerhalb der ersten 15min NIR-Bestrahlung im Vergleich mit der Autofluoreszenz. Da diese kontinuierlich abfällt kann geschlussfolgert werden, dass der beobachtete Effekt nicht aus Prozessen, welche die Autofluoreszenz beeinflussen, entsteht, sondern einen anderen Ursprung haben muss. Man kann an dieser Stelle die Vermutung anstellen, ob dieser Anstieg durch das freigesetzte NO verursacht wurde. Um dies abschließend zu klären, müsste allerdings eine weitere Experimentalserie folgen, in der die Veränderung der Fluoreszenz bei einem gefärbten Schnitt, allerdings ohne zwischenzeitliche Infrarotbestrahlung untersucht wird. Aus diesen Ergebnissen könnte für jeden Zeitpunkt eine Grundfluoreszenz ohne Bestrahlung ermittelt werden. Um mögliche Anstiege der Fluoreszenz durch die Kinetik des Farbstoffs auszuschließen, müssten diese ermittelten Werte als Referenz für die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse dienen.

Eine weitere Frage ist, warum der Anstieg besonders in den ersten 15 Minuten zu beobachten ist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen, bei denen eine Arteriole bestrahlt wurde. Auch hier war die schnellste Dilatation in diesem Zeitraum zu beobachten. Eine mögliche Erklärung findet sich in den begrenzten metabolischen

Reserven und der fehlenden Blutzirkulation im Hirnschnitt. Die Reserven an NO, welches an Hämoglobin gebunden ist, könnte innerhalb dieser Zeit verbraucht sein, sodass danach kein weiterer Anstieg beobachtet werden kann. Im lebenden Organismus wird allerdings durch den Blutkreislauf immer wieder neues Hämoglobin herantransportiert, welches als potentieller NO-Donator fungieren kann. In weiteren Experimenten am lebenden Tier könnte so eventuell ein größerer und auch längerfristiger Effekt beobachtet werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse zur Infrarotbestrahlung, dass eine solche sich positiv auf den Vasospasmus durch die hervorgerufene Dilatation auswirken kann. Wie oben beschrieben gibt es einen Hinweis darauf, dass diese durch eine Freisetzung von NO verursacht wird. Um diese Aussagen zu bekräftigen und zu validieren, muss die Datenlage allerdings weiterhin aufgestockt werden und die Methodik zum Nachweis der Fluoreszenz verbessert werden.

6. Schlussfolgerungen

Im Nachhinein können die anfänglich formulierten Arbeitshypothesen durch die Ergebnisse der Versuchsreihen bewertet werden.

Sowohl Z-PDP A1/2, als auch Z-BOX A verursachten eine konzentrationsabhängige Kontraktion der penetrierenden Arteriolen. Während die PDPs bereits ab einer Konzentration von $0,5\mu\text{M}$ eine Sättigung ihrer Vasoaktivität zeigten, stieg das konstriktive Potential von BOX A mit höheren Konzentrationen weiter an. In Bezug auf das klinische Bild des zerebralen Vasospasmus nach einer SAB, treten die PDPs durch diese Untersuchungen in den Vordergrund. Sie konnten in Liquorproben in effektiven Konzentrationen nachgewiesen werden, im Gegensatz zu den BOXes, die in Konzentrationen vorkommen, die im Experiment keine Kontraktion hervorriefen.

BOX C zeigte ein vasoaktives Potential, welches abhängig vom BK-Kanal ist. Seine Rolle im Pathomechanismus des zerebralen Vasospasmus ist allerdings noch ungeklärt. Zwar konnte die Substanz in menschlichen Gallensteinen nachgewiesen werden, allerdings noch nicht in Liquorproben (Ritter et al. 2018).

Die Umwandlung von Z-BOX A in seine *E*-konfigurierte Form führte zu einem Wirkverlust der Substanz, sodass es keine Gefäßverengung mehr auslösen konnte. Als mögliche Therapieoption scheint diese Umwandlung zwar theoretisch möglich zu sein, allerdings stellt sich die Frage, wie stabil die *E*-konfigurierten Formen im Liquor sind und wie sich andere HDPs nach der Konfigurationsänderung verhalten. Die anfänglich aufgestellte Hypothese wurde durch die durchgeführten Versuche bestätigt.

Die Bestrahlung mit Nahinfrarotlicht konnte Arteriolen im akuten Hirnschnitt dilatieren und stellt somit eine mögliche Gegenmaßnahme zum Vasospasmus da. Auch wenn die HDPs nicht direkt beeinflusst werden, greift die Bestrahlung in den Pathomechanismus des Vasospasmus ein, indem die NO-Verfügbarkeit erhöht und damit der funktionelle Mangel wieder ausgeglichen werden kann.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adelman JP, Shen K-Z, Kavanaugh MP, Warren RA, Wu Y-N, Lagrutta A, Bond CT, North RA. 1992. Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron*, 9 (2):209-216.
- Ankri R, Lubart R, Taitelbaum H. 2010. Estimation of the optimal wavelengths for laser-induced wound healing. *Lasers in surgery and medicine*, 42 (8):760-764.
- Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Monge J-C, Mohamed F, Bendeck MP, Stewart DJ. 1998. Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor. *Circulation research*, 82 (9):1007-1015.
- Bao L, Cox DH. 2005. Gating and ionic currents reveal how the BKCa channel's Ca²⁺ sensitivity is enhanced by its β 1 subunit. *The Journal of general physiology*, 126 (4):393-412.
- Bao L, Kaldany C, Holmstrand EC, Cox DH. 2004. Mapping the BKCa channel's "Ca²⁺ bowl": Side-chains essential for Ca²⁺ sensing. *Journal of General Physiology*, 123 (5):475-489.
- Bayliss WM. 1902. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *The Journal of physiology*, 28 (3):220-231.
- Bederson JB, Connolly ES, Jr., Batjer HH, Dacey RG, Dion JE, Diringer MN, Duldner JE, Jr., Harbaugh RE, Patel AB, Rosenwasser RH, American Heart A. 2009. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke*, 40 (3):994-1025.
- Bendszus M, Jung C, Hacke W, Unterberg A. 2016. Intrakranielle arterielle Aneurysmen und Subarachnoidalblutungen. *Neurologie*. Springer, 283-300.
- Berendes E, Walter M, Cullen P, Prien T, Van Aken H, Horsthemke J, Schulte M, von Wild K, Scherer R. 1997. Secretion of brain natriuretic peptide in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *The Lancet*, 349 (9047):245-249.
- Bonnett R, Stewart JCM. 1975. Photo-oxidation of bilirubin in hydroxylic solvents. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (3):224-231.
- Borel CO, McKee A, Parra A, Haglund MM, Solan A, Prabhakar V, Sheng H, Warner DS, Niklason L. 2003. Possible role for vascular cell proliferation in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 34 (2):427-433.
- Boullin D, Bunting S, Blaso W, Hunt T, Moncada S. 1979. Responses of human and baboon arteries to prostaglandin endoperoxides and biologically generated

- and synthetic prostacyclin: their relevance to cerebral arterial spasm in man. *British journal of clinical pharmacology*, 7 (2):139-147.
- Brayden JE, Nelson MT. 1992. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science*, 256 (5056):532-535.
- Brenner R, Jegla TJ, Wickenden A, Liu Y, Aldrich RW. 2000. Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel β subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (9):6453-6461.
- Brown L, Key B, Lovick T. 1999. Bio-imaging of nitric oxide-producing neurones in slices of rat brain using 4, 5-diaminofluorescein. *Journal of neuroscience methods*, 92 (1):101-110.
- Brown L, Key B, Lovick T. 2000. Fluorescent imaging of nitric oxide production in neuronal varicosities associated with intraparenchymal arterioles in rat hippocampal slices. *Neuroscience letters*, 294 (1):9-12.
- Burwell LS, Nadtochiy SM, Brookes PS. 2009. Cardioprotection by metabolic shut-down and gradual wake-up. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 46 (6):804-810.
- Butler A, Tsunoda S, McCobb DP, Wei A, Salkoff L. 1993. mSlo, a complex mouse gene encoding" maxi" calcium-activated potassium channels. *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-*, 261:221-221.
- Chen L, Tian L, MacDonald SH-F, McClafferty H, Hammond MS, Huibant J-M, Ruth P, Knaus H-G, Shipston MJ. 2005. Functionally diverse complement of large conductance calcium-and voltage-activated potassium channel (BK) α -subunits generated from a single site of splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (39):33599-33609.
- Chouchani ET, Methner C, Nadtochiy SM, Logan A, Pell VR, Ding S, James AM, Cochemé HM, Reinhold J, Lilley KS. 2013. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nature medicine*, 19 (6):753.
- Chow M, Dumont AS, Kassell NF. 2002. Endothelin receptor antagonists and cerebral vasospasm: an update. *Neurosurgery*, 51 (6):1333-1342.
- Clark JF, Sharp FR. 2006. Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26 (10):1223-1233.

- Clark JF, Reilly M, Sharp FR. 2002. Oxidation of Bilirubin Produces Compounds that Cause Prolonged Vasospasm of Rat Cerebral Vessels: A Contributor to Subarachnoid Hemorrhage–Induced Vasospasm. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 22 (4):472-478.
- Cook DA, Vollrath B. 1995. Free radicals and intracellular events associated with cerebrovascular spasm. *Cardiovascular research*, 30 (4):493-500.
- Dick GM, Rossow CF, Smirnov S, Horowitz B, Sanders KM. 2001. Tamoxifen activates smooth muscle BK channels through the regulatory $\beta 1$ subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (37):34594-34599.
- Dopico AM, Kirber MT, Singer JJ, Walsh JV. 1994. Membrane stretch directly activates large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in mesenteric artery smooth muscle cells. *American journal of hypertension*, 7 (1):82-89.
- Dumont AS, Dumont RJ, Chow MM, Lin C-I, Calisaneller T, Ley KF, Kassell NF, Lee KS. 2003. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: putative role of inflammation. *Neurosurgery*, 53 (1):123-135.
- Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, Beckingham K, Chandy KG, Cahalan MD, Aiyar J. 1999. Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1 . *J Biol Chem*, 274 (9):5746-5754.
- Faßbender K, Hodapp B, Rossol S, Bertsch T, Schmeck J, Schütt S, Fritzinger M, Horn P, Vajkoczy P, Wendel-Wellner M. 2000. Endothelin-1 in subarachnoid hemorrhage: an acute-phase reactant produced by cerebrospinal fluid leukocytes. *Stroke*, 31 (12):2971-2975.
- Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. 2009. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *The Lancet Neurology*, 8 (4):355-369.
- Fischer H, Dobeneck HFv. 1940. Über die Pentdyopent-Reaktion. II. Mitteilung. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 263 (3-5):125-146.
- Girouard H, Bonev AD, Hannah RM, Meredith A, Aldrich RW, Nelson MT. 2010. Astrocytic endfoot Ca^{2+} and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (8):3811-3816.
- Gladwin MT, Raat NJ, Shiva S, Dezfulian C, Hogg N, Kim-Shapiro DB, Patel RP. 2006. Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to

- hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291 (5):H2026-H2035.
- Govindaraju V, Teoh H, Hamid Q, Cernacek P, Ward ME. 2005. Interaction between endothelial heme oxygenase-2 and endothelin-1 in altered aortic reactivity after hypoxia in rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 288 (2):H962-H970.
- Günther M. 2017. Einfluss intermediärer Hämoglobinabbauprodukte auf die Vasoreaktivität zerebraler Arteriolen im akuten Hirnschnitt der Maus [Bachelorarbeit]. Jena:Friedrich-Schiller-Universität
- Hacke W. 2016. *Neurologie*. Springer Verlag, 14. Auflage:S. 241-300.
- Hart RG, Byer JA, Slaughter JR, Hewett JE, Easton DJ. 1981. Occurrence and implications of seizures in subarachnoid hemorrhage due to ruptured intracranial aneurysms. *Neurosurgery*, 8 (4):417-421.
- Hendgen-Cotta UB, Merx MW, Shiva S, Schmitz J, Becher S, Klare JP, Steinhoff H-J, Goedecke A, Schrader J, Gladwin MT. 2008. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (29):10256-10261.
- Horrigan FT, Aldrich RW. 2002. Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *The Journal of general physiology*, 120 (3):267-305.
- Hou S, Heinemann SH, Hoshi T. 2009. Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules. *Physiology*, 24 (1):26-35.
- Hou S, Xu R, Clark JF, Wurster WL, Heinemann SH, Hoshi T. 2011. Bilirubin oxidation end products directly alter K⁺ channels important in the regulation of vascular tone. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31 (1):102-112.
- Hunt WE, Hess RM. 1968. Surgical risk as related to time of intervention in the repair of intracranial aneurysms. *Journal of neurosurgery*, 28 (1):14-20.
- Joerk A, Seidel RA, Walter SG, Wiegand A, Kahnes M, Klopffleisch M, Kirmse K, Pohnert G, Westerhausen M, Witte OW, Holthoff K. 2014. Impact of heme and heme degradation products on vascular diameter in mouse visual cortex. *J Am Heart Assoc*, 3 (4).
- Joerk A, Ritter M, Langguth N, Seidel RA, Freitag D, Herrmann KH, Schaefgen A, Guenther M, Sommer C, Braemer D, Walter J, Ewald C, Kalff R, Reichenbach

- JR, Westerhausen M, Pohnert G, Witte OW, Holthoff K. 2018. Proentdyopents as heme degradation intermediates constrict mouse cerebral arterioles and are present in the cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage. Eingereicht
- Jörk A. 2013. Einfluss von Häm und Hämabbauprodukten auf die zerebrale Gefäßreaktibilität im visuellen Kortex der Maus [Dissertation]. Jena:Friedrich-Schiller-Universität.
- Jung CS, Iuliano BA, Harvey-White J, Espey MG, Oldfield EH, Pluta RM. 2004. Association between cerebrospinal fluid levels of asymmetric dimethyl-L-arginine, an endogenous inhibitor of endothelial nitric oxide synthase, and cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *Journal of neurosurgery*, 101 (5):836-842.
- Keszler A, Brandal G, Baumgardt S, Ge ZD, Pratt PF, Riess ML, Bienengraeber M. 2014. Far red/near infrared light-induced protection against cardiac ischemia and reperfusion injury remains intact under diabetic conditions and is independent of nitric oxide synthase. *Front Physiol*, 5:305.
- Kirber MT, Ordway RW, Clapp LH, Walsh Jr JV, Singer JJ. 1992. Both membrane stretch and fatty acids directly activate large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in vascular smooth muscle cells. *FEBS letters*, 297 (1-2):24-28.
- Klopfleisch M, Seidel RA, Görls H, Richter H, Beckert R, Imhof W, Reiher M, Pohnert G, Westerhausen M. 2013. Total synthesis and detection of the bilirubin oxidation product (z)-2-(3-ethenyl-4-methyl-5-oxo-1, 5-dihydro-2 h-pyrrol-2-ylidene) ethanamide (z-box a). *Organic letters*, 15 (17):4608-4611.
- Kluge A, Zimmermann R, Weihrauch D, Mohri M, Sack S, Schaper J, Schaper W. 1997. Coordinate expression of the insulin-like growth factor system after microembolisation in porcine heart. *Cardiovascular research*, 33 (2):324-331.
- Knaus HG, Eberhart A, Glossmann H, Munujos P, Kaczorowski GJ, Garcia ML. 1994. Pharmacology and structure of high conductance calcium-activated potassium channels. *Cell Signal*, 6 (8):861-870.
- Kolias AG, Sen J, Belli A. 2009. Pathogenesis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: putative mechanisms and novel approaches. *Journal of neuroscience research*, 87 (1):1-11.

- Krishnamoorthy G, Shi J, Sept D, Cui J. 2005. The NH 2 terminus of RCK1 domain regulates Ca²⁺-dependent BK Ca channel gating. *The Journal of general physiology*, 126 (3):227-241.
- Kühl P. 1994. Excess-substrate inhibition in enzymology and high-dose inhibition in pharmacology: a reinterpretation. *Biochemical Journal*, 298 (Pt 1):171.
- Lampl Y, Zivin JA, Fisher M, Lew R, Welin L, Dahlof B, Borenstein P, Andersson B, Perez J, Caparo C. 2007. Infrared laser therapy for ischemic stroke: a new treatment strategy: results of the NeuroThera Effectiveness and Safety Trial-1 (NEST-1). *Stroke*, 38 (6):1843-1849.
- Leslie JB, Watkins WD. 1985. Eicosanoids in the central nervous system. *Journal of neurosurgery*, 63 (5):659-668.
- Linn FH, Voorbij HA, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. 2005. Visual inspection versus spectrophotometry in detecting bilirubin in cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76 (10):1452-1454.
- Lohr NL, Keszler A, Pratt P, Bienengraber M, Warltier DC, Hogg N. 2009. Enhancement of nitric oxide release from nitrosyl hemoglobin and nitrosyl myoglobin by red/near infrared radiation: potential role in cardioprotection. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 47 (2):256-263.
- Macdonald R, Kassell N, Mayer S, Schmiedek P, Weidauer S, Pasqualin A. 2007. Randomized trial of clazosentan for prevention of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*, 106 (5):A946-A946.
- Maines M. 2000. The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 46 (3):573-585.
- Marletta MA. 1989. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends in biochemical sciences*, 14 (12):488-492.
- Masuhr KF, Masuhr F, Neumann M. 2013. *Duale Reihe Neurologie*. Georg Thieme Verlag.
- Mayer S, Fink M, Homma S, Sherman D, LiMandri G, Lennihan L, Solomon R, Klebanoff L, Beckford A, Raps E. 1994. Cardiac injury associated with neurogenic pulmonary edema following subarachnoid hemorrhage. *Neurology*, 44 (5):815-815.
- Mijailovic M, Lukic S, Laudanovic D, Folic M, Folic N, Jankovic S. 2013. Effects of nimodipine on cerebral vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage treated by endovascular coiling. *Advances in clinical and*

- experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University, 22 (1):101-109.
- Miyauchi T, Masaki T. 1999. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annual review of physiology*, 61 (1):391-415.
- Molyneux AJ, Birks J, Clarke A, Sneade M, Kerr RSC. 2015. The durability of endovascular coiling versus neurosurgical clipping of ruptured cerebral aneurysms: 18 year follow-up of the UK cohort of the International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT). *Lancet*, 385 (9969):691-697.
- Moore P, Oluyomi A, Babbedge R, Wallace P, Hart S. 1991. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *British journal of pharmacology*, 102 (1):198-202.
- Mülsch A, Busse R. 1990. N G-nitro-L-arginine (N 5-[imino (nitroamino) methyl]-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 341 (1-2):143-147.
- Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes J, Fishman M. 1998. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *The Journal of clinical investigation*, 101 (11):2567-2578.
- Naeser MA, Saltmarche A, Krengel MH, Hamblin MR, Knight JA. 2011. Improved cognitive function after transcranial, light-emitting diode treatments in chronic, traumatic brain injury: two case reports. *Photomedicine and laser surgery*, 29 (5):351-358.
- Niu X, Qian X, Magleby KL. 2004. Linker-gating ring complex as passive spring and Ca²⁺-dependent machine for a voltage-and Ca²⁺-activated potassium channel. *Neuron*, 42 (5):745-756.
- Oron U, Yaakobi T, Oron A, Hayam G, Gepstein L, Rubin O, Wolf T, Haim SB. 2001. Attenuation of infarct size in rats and dogs after myocardial infarction by low-energy laser irradiation. *Lasers in surgery and medicine*, 28 (3):204-211.
- Pfeiffer S, Leopold E, Schmidt K, Brunner F, Mayer B. 1996. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *British journal of pharmacology*, 118 (6):1433-1440.

- Piantadosi CA. 2012. Regulation of mitochondrial processes by protein S-nitrosylation. *Biochim Biophys Acta*, 1820 (6):712-721.
- Plüger S, Faulhaber J, Fürstenau M, Löhn M, Waldschütz R, Gollasch M, Haller H, Luft FC, Ehmke H, Pongs O. 2000. Mice with disrupted BK channel $\beta 1$ subunit gene feature abnormal Ca^{2+} spark/STOC coupling and elevated blood pressure. *Circulation research*, 87 (11):e53-e60.
- Pluta RM. 2005. Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: review, new hypothesis, and proposed treatment. *Pharmacology & therapeutics*, 105 (1):23-56.
- Pluta RM, Thompson BG, Dawson TM, Snyder SH, Boock RJ, Oldfield EH. 1996. Loss of nitric oxide synthase immunoreactivity in cerebral vasospasm. *Journal of neurosurgery*, 84 (4):648-654.
- Pradilla G, Thai Q-A, Legnani FG, Hsu W, Kretzer RM, Wang PP, Tamargo RJ. 2004. Delayed intracranial delivery of a nitric oxide donor from a controlled-release polymer prevents experimental cerebral vasospasm in rabbits. *Neurosurgery*, 55 (6):1393-1400.
- Pyne-Geithman GJ, Morgan CJ, Wagner K, Dulaney EM, Carrozzella J, Kanter DS, Zuccarello M, Clark JF. 2005. Bilirubin production and oxidation in CSF of patients with cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 25 (8):1070-1077.
- Pyne GJ, Cadoux-Hudson TA, Clark JF. 2000. The presence of an extractable substance in the CSF of humans with cerebral vasospasm after subarachnoid haemorrhage that correlates with phosphatase inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1474 (3):283-290.
- Pyne GJ, Cadoux-Hudson TA, Clark JF. 2003. Platelets play an essential role in the aetiology of cerebral vasospasm after subarachnoid haemorrhage. *Medical hypotheses*, 60 (4):525-530.
- Raabe A, Beck J, Berkefeld J, Deinsberger W, Meixensberger J, Schmiedek P, Seifert V, Steinmetz H, Unterberg A, Vajkoczy P. 2005. Empfehlungen zum Management der aneurysmatischen Subarachnoidalblutung. *Zentralblatt für Neurochirurgie*, 66 (02):79-91.
- Rassow J, Hauser K, Netzke R, Deutzmann R. 2012. *Biochemie. Duale Reihe*. 3. Auflage Stuttgart: Thieme.

- Rees D, Palmer R, Schulz R, Hodson H, Moncada S. 1990. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *British journal of pharmacology*, 101 (3):746-752.
- Rettig R, Kuschinsky W. 2008. *Kreislauf. Physiologie* Elsevier Urban & Fischer Verlag, 5:414-447.
- Ritter M, Neupane S, Seidel RA, Steinbeck C, Pohnert G. 2018. In vivo and in vitro identification of Z-BOX C—a new bilirubin oxidation end product. *Organic & biomolecular chemistry*, 16 (19):3553-3555.
- Ritter M, Seidel RA, Bellstedt P, Schneider B, Bauer M, Gorls H, Pohnert G. 2016. Isolation and Identification of Intermediates of the Oxidative Bilirubin Degradation. *Org Lett*, 18 (17):4432-4435.
- Saleem F, Rowe I, Shipston M. 2009. Characterization of BK channel splice variants using membrane potential dyes. *British journal of pharmacology*, 156 (1):143-152.
- Salkoff L, Butler A, Ferreira G, Santi C, Wei A. 2006. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci*, 7 (12):921-931.
- Sausbier M, Hu H, Arntz C, Feil S, Kamm S, Adelsberger H, Sausbier U, Sailer C, Feil R, Hofmann F. 2004. Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca²⁺-activated K⁺ channel deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (25):9474-9478.
- Schievink WI, Michels VV, Piepgras DG. 1994. Neurovascular manifestations of heritable connective tissue disorders. A review. *Stroke*, 25 (4):889-903.
- Schreiber M, Salkoff L. 1997. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J*, 73 (3):1355-1363.
- Scott RB, Eccles F, Molyneux AJ, Kerr RS, Rothwell PM, Carpenter K. 2010. Improved cognitive outcomes with endovascular coiling of ruptured intracranial aneurysms: neuropsychological outcomes from the International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT). *Stroke*, 41 (8):1743-1747.
- Sercombe R, Dinh YRT, Gomis P. 2002. Cerebrovascular inflammation following subarachnoid hemorrhage. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 88 (3):227-249.
- Sommer C. 2017. Neue Therapieoptionen bei zerebralem Vasospasmus? Einfluss von NS1619 und Nahinfrarotillumination auf den Gefäßdurchmesser

zerebraler Arteriolen im akuten Hirnschnitt [Bachelorarbeit]. Jena:Friedrich-Schiller-Universität

- Spetzler RF, McDougall CG, Zabramski JM, Albuquerque FC, Hills NK, Russin JJ, Partovi S, Nakaji P, Wallace RC. 2015. The barrow ruptured aneurysm trial: 6-year results. *Journal of neurosurgery*, 123 (3):609-617.
- Sprossmann F, Pankert P, Sausbier U, Wirth A, Zhou XB, Madlung J, Zhao H, Bucurenciu I, Jakob A, Lamkemeyer T. 2009. Inducible knockout mutagenesis reveals compensatory mechanisms elicited by constitutive BK channel deficiency in overactive murine bladder. *The FEBS journal*, 276 (6):1680-1697.
- Steinmetz H. 2012. Subarachnoidalblutung (SAB). Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.
- Svendgaard N-A, Shiokawa Y, Delgado-Zygmunt T, Arbab M-R, Skagerberg G, Bran A. 1992. Effect of lesioning of medullary catecholamine neurons or the median eminence on the development of cerebral vasospasm in the squirrel monkey. *Acta neurochirurgica*, 118 (3-4):137-145.
- Terpolilli NA, Feiler S, Dienel A, Müller F, Heumos N, Friedrich B, Stover J, Thal S, Schöller K, Plesnila N. 2016. Nitric oxide inhalation reduces brain damage, prevents mortality, and improves neurological outcome after subarachnoid hemorrhage by resolving early pial microvasospasms. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36 (12):2096-2107.
- Tian L, Duncan RR, Hammond MS, Coghill LS, Wen H, Rusinova R, Clark AG, Levitan IB, Shipston MJ. 2001. Alternative splicing switches potassium channel sensitivity to protein phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (11):7717-7720.
- Toro L, Wallner M, Meera P, Tanaka Y. 1998. Maxi-KCa, a unique member of the voltage-gated K channel superfamily. *Physiology*, 13 (3):112-117.
- Turner CP, Bergeron M, Matz P, Zegna A, Noble LJ, Panter SS, Sharp FR. 1998. Heme oxygenase-1 is induced in glia throughout brain by subarachnoid hemoglobin. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 18 (3):257-273.
- Wang X, Tian F, Reddy DD, Nalawade SS, Barrett DW, Gonzalez-Lima F, Liu H. 2017. Up-regulation of cerebral cytochrome-c-oxidase and hemodynamics by transcranial infrared laser stimulation: a broadband near-infrared spectroscopy study. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37 (12):3789-3802.

- Wang Y-W, Ding JP, Xia X-M, Lingle CJ. 2002. Consequences of the stoichiometry of Slo1 α and auxiliary β subunits on functional properties of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Journal of Neuroscience*, 22 (5):1550-1561.
- Wurster W, Pyne-Geithman G, Peat I, Clark JF. 2008. Bilirubin oxidation products (BOXes): synthesis, stability and chemical characteristics. *Cerebral Vasospasm*:43-50.
- Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J, Adelman JP. 1998. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, 395 (6701):503-507.
- Xu Y, Krukoff TL. 2007. Adrenomedullin stimulates nitric oxide production from primary rat hypothalamic neurons: roles of calcium and phosphatases. *Molecular pharmacology*, 72 (1):112-120.
- Yan J, Aldrich RW. 2010. LRRC26 auxiliary protein allows BK channel activation at resting voltage without calcium. *Nature*, 466 (7305):513.
- Yan J, Aldrich RW. 2012. BK potassium channel modulation by leucine-rich repeat-containing proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (20):7917-7922.
- Yang Y, Li P-Y, Cheng J, Cai F, Lei M, Tan X-Q, Li M-L, Liu Z-F, Zeng X-R. 2013. IP_3 decreases coronary artery tone via activating the BK Ca channel of coronary artery smooth muscle cells in pigs. *Biochemical and biophysical research communications*, 439 (3):363-368.
- Yoshino M, Murakami K. 2015. Analysis of the substrate inhibition of complete and partial types. *SpringerPlus*, 4 (1):292.
- Yuan P, Leonetti MD, Pico AR, Hsiung Y, MacKinnon R. 2010. Structure of the human BK channel Ca^{2+} -activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science*, 329 (5988):182-186.
- Zhao G, Neeb ZP, Leo MD, Pachua J, Adebiyi A, Ouyang K, Chen J, Jaggar JH. 2010. Type 1 IP_3 receptors activate BKCa channels via local molecular coupling in arterial smooth muscle cells. *The Journal of general physiology*, 136 (3):283-291.
- Ziu E, Mesfin FB. 2017. Subarachnoid Hemorrhage. *StatPearls*. Treasure Island (FL).

Zivin JA, Albers GW, Bornstein N, Chippendale T, Dahlof B, Devlin T, Fisher M, Hacke W, Holt W, Ilic S. 2009. Effectiveness and safety of transcranial laser therapy for acute ischemic stroke. *Stroke*, 40 (4):1359-1364.

Anhang

Danksagung

Zunächst möchte ich Professor Dr. Otto W. Witte danken, dem Leiter der Hans-Berger-Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Jena. Die Bereitstellung der nötigen Infrastruktur machte diese Arbeit überhaupt erst möglich. Auch danke ich Professor Dr. rer. nat. Knut Holthoff für die Bereitstellung sämtlichen Laborequipments und des nötigen Wissens für eine erfolgreiche Durchführung, für die gute Betreuung während der experimentellen Phase und für konstruktive Vorschläge bei Problemen.

Das größte Dankeschön geht an Dr. med. Alexander Jörk für die unglaubliche Betreuung in allen Phasen der Arbeit. Für die gute Einführung sowohl theoretisch, als auch praktisch in der Anfangsphase, die die Grundlage für diese Arbeit bildete, für die hilfreichen Tipps und anregenden Diskussionen während der Experimente, für die angenehme Zusammenarbeit, für die Hilfe bei der Erstellung von Vorträgen und die große Hilfe bei der Erstellung dieser Dissertationsschrift.

Charline Sommer möchte ich danken, die ihre Bachelorarbeit während der Laborzeit anfertigte. Viele hilfreiche Diskussionen, aber auch viele unterhaltsame Momente entstanden während der gemeinsamen Laborzeit, von denen wir gegenseitig profitieren konnten.

Ich danke außerdem dem ganzen Team der AG Bioluminescence Dr. med. Knut Kirmse, Jürgen Graf, Tom Flossmann, Chuanquiang Zhang und Thomas Kaas für die freundliche Integration in die Arbeitsgruppe und für das offene Ohr und hilfreichen Tipps während der Experimente. Tom Flossmann möchte ich einen extra Dank entgegenbringen für die Einweisung in die konfokale Mikroskopie.

Weiterhin gilt mein Dank Marcel Ritter und Daniel Schulze (IAAC Jena) für die Herstellung der HDP-Proben, die nachträgliche Analyse, die gewinnbringenden Diskussionen und das Korrekturlesen dieser Arbeit im Hinblick auf chemische Aspekte.

Ich danke dem kompletten Team der Experimentellen Neurologie, vor allem Frau Ina Ingrisch für die Durchführung der PCR-Genotypisierungen, aber auch allen anderen Mitarbeitern für die entgegengebrachte Unterstützung.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der DFG-Forschergruppe FOR 1738: „*Heme and heme degradation products – alternative functions and signaling mechanisms*“ für das Einbinden meiner Dissertation und die Chance meine Ergebnisse in diesem Rahmen zu präsentieren und nützliche Kommentare erhalten zu haben.

Ich danke dem Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung Jena (IZKF) und der Ernst-Abbe-Stiftung für die Gewährung eines Promotionsstipendiums, ohne das diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte meinen Freunden und Mitbewohnern danken, besonders Friederike Woesthoff für ein offenes Ohr bei Sorgen im Laufe der Doktorarbeit und die ständige Ermutigung, die mir entgegengebracht wurde.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Familie, meiner Schwester Anna Langguth und meinen Eltern Regina und Matthias Langguth für die Unterstützung während meiner Schullaufbahn, meinem Studium und während der Doktorarbeit.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. Otto W. Witte

Prof. Dr. rer. nat. Knut Holthoff

Dr. med. Alexander Jörk

Marcel Ritter

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

21.01.2021

Niklas Langguth